



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

COMPREENDER AS MASTITES BOVINAS: RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE
CÉLULAS SOMÁTICAS E A INCIDÊNCIA DE MASTITES CLÍNICAS

NELSON FILIPE SILVA BENEVIDES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor George Thomas Stilwell
Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima
Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

COMPREENDER AS MASTITES BOVINAS: RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE
CÉLULAS SOMÁTICAS E A INCIDÊNCIA DE MASTITES CLÍNICAS

NELSON FILIPE SILVA BENEVIDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor George Thomas Stilwell
Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima
Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

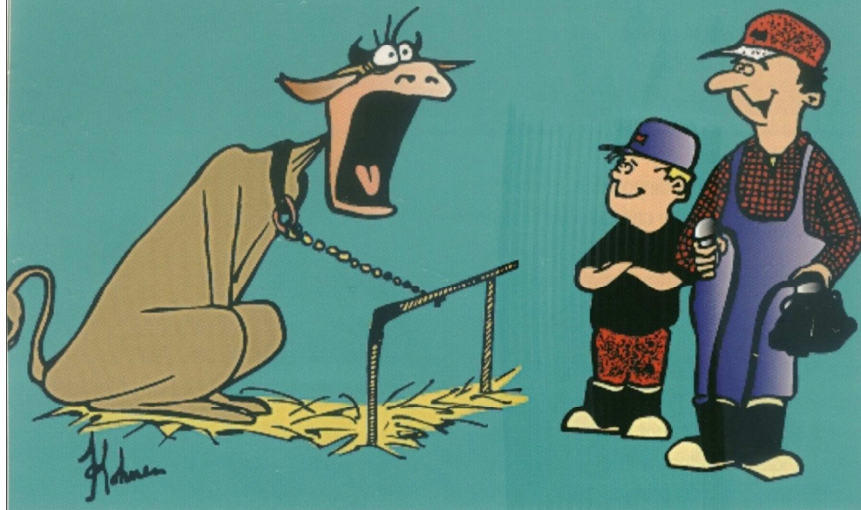
2014

LISBOA

Aos meus pais, Leomena e João Benevides.

*Dedicado à memória de
Cristina Vilela.*

Fonte: Lévesque, 2004.



"The vet should not have told her that our milking procedure was a risk factor for mastitis!"

«The difference between what we can do and what we do is sufficient to cure most of the worlds problems.» Mahatma Gandhi.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, Pai Eterno;
- Aos meus pais e irmãos;
- Aos meus avós;
- Ao Professor Doutor Miguel Saraiva Lima (Faculdade de Medicina Veterinária – ULISBOA);
- Ao Professor Doutor George Stilwell (Faculdade de Medicina Veterinária – ULISBOA);
- Ao Professor Doutor Ricardo Bexiga (Faculdade de Medicina Veterinária – ULISBOA);
- À Professora Doutora Cristina Vilela (Faculdade de Medicina Veterinária – ULISBOA);
- À Professora Doutora Yolanda Vaz (Faculdade de Medicina Veterinária – ULISBOA);
- À Carla Carneiro (Faculdade de Medicina Veterinária – ULISBOA);
- Ao proprietário da exploração e a todos os seus colaboradores, em especial à Engenheira Paula Silva e ao Engenheiro Ricardo Basílio;
- À Professora Doutora Anabela Moreira (Faculdade de Medicina Veterinária – ULISBOA);
- Ao Doutor João Vidal (Associação Agrícola de São Miguel)
- Ao Doutor Pedro Reis (Associação Agrícola de São Miguel)
- Ao Doutor Carsten Dammert (Médico Veterinário particular);
- Ao Professor George Shook (School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, USA);
- À Professora Doutora Andreza Fernandes (Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos Alimentos, Universidade de São Paulo, Brasil);
- Ao Doutor Pedro Pinho (Ceva Saúde Animal);
- Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA/FMV);
- E a todos os que, de certa forma, possibilitaram que este trabalho fosse possível.

A todos, o meu muito obrigado.

COMPREENDER AS MASTITES BOVINAS: RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E A INCIDÊNCIA DE MASTITES CLÍNICAS.

RESUMO

As mastites bovinas constituem uma das doenças mais frequentes e com maior impacto económico nas explorações leiteiras. O presente trabalho procurou descrever a relação entre a contagem de células somáticas (CCS) e a incidência de mastites clínicas, e foi realizado numa exploração de bovinos leiteiros da região do Ribatejo, com cerca de 400 vacas em lactação da raça *Holstein Friesian*. A exploração foi caracterizada para um conjunto de fatores que podem influenciar a dinâmica de infeções intramamárias: animal, ambiente e/ou manejo, nutrição, ordenha e micro-organismos.

A contagem de células somáticas de leite de tanque anual do efetivo aumentou de 2007 para 2008. Com base no limiar das 200 000 células somáticas/ml de leite de vacas individuais determinou-se a percentagem de animais infetados e não infetados; com infeções crónicas, com infeções recentes, com auto-cura de infeções recentes e sem infeção; e a eficácia da terapêutica de secagem. De uma forma geral, tendo em conta estes parâmetros, constatou-se que a situação do efetivo piorou de 2007 para 2008.

Em termos de mastites clínicas, as taxas de mastites e de recorrência foram mais elevadas em 2008 do que em 2007. As incidências médias de mastites clínicas por mês foram iguais em 2007 e em 2008. A incidência de mastites clínicas (IMC) por lactação, tanto em 2007 como em 2008, aumentou com o aumento do número de lactações, à exceção da transição da 3.^a para 4.^a lactação. Em 2008, a IMC por períodos de lactação de 60 dias, foi mais elevada nos primeiros 60 dias pós-parto, e, posteriormente foi diminuindo com o decorrer da lactação. Os micro-organismos mais frequentemente isolados, tanto de casos de mastite clínica como de mastite subclínica, foram *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus coagulase negativos*. De casos de mastite clínica de grau II isolaram-se sobretudo bactérias de Gram positivo, enquanto nas de grau III foram, predominantemente, bactérias de Gram negativo.

Relativamente ao estudo caso-controlo: relação entre a CCS de casos (animais diagnosticados com mastite clínica) e controlos (animais sem sinais visíveis de mastite clínica), verificou-se que a média de CCS dos casos foi mais elevada do que a dos controlos. No entanto, as diferenças registadas apenas foram estatisticamente significativas para a última e penúltima CCS antes do diagnóstico de mastite clínica.

Palavras-chave: mastites bovinas, contagem de células somáticas; mastite clinica; micro-organismos, mastite subclínica.

UNDERSTANDING BOVINE MASTITIS: RELATIONSHIP BETWEEN SOMATIC CELL
COUNTS AND CLINICAL MASTITIS INCIDENCE

ABSTRACT

Bovine mastitis remains one of the most frequent diseases and with the greatest economic impact in commercial dairy farms. The present work describes the relationship between somatic cell count (SCC) and clinical mastitis incidence, and was conducted in a dairy herd in the Ribatejo region, with around 400 lactating Holstein Friesian cows. The farm was characterized for a group of factors that can influence the dynamics of intramammary infections: animal, environment and/or management, nutrition, milking and microorganisms.

The annual bulk milk somatic cell count of the herd increased from 2007 to 2008. Based on the threshold of 200,000 cells/ml we determined the proportion of animals that were infected and not infected; with chronic infections, recent infections self-cure of recent infections and without infections; and the efficacy of dry cow therapy. In general, these parameters showed that the situation of the herd worsened from 2007 to 2008.

Regarding clinical mastitis, the rate of mastitis and the recurrence rate were higher in 2008 than in 2007. The mean incidences of clinical mastitis per month were the same in 2007 and 2008. In 2007 and 2008, the clinical mastitis incidence (CMI) per lactation number, increased with increasing number of lactation, except in the transition from 3rd to 4th lactation. In 2008, CMI per lactation period of 60 days was higher during the first 60 days post-partum, and subsequently decreased over the course of lactation. The most frequently isolated microorganisms, both from clinical and subclinical mastitis cases were *Streptococcus uberis* and coagulase-negative *Staphylococcus*. Gram-positive bacteria were isolated mainly from grade II clinical mastitis cases, while Gram-negative bacteria were predominantly isolated from grade III clinical mastitis cases.

For the case-control study: relationship between SCC of cases (animals diagnosed with clinical mastitis) and controls (animals without visible signs of clinical mastitis), we found that the average SCC of the cases was higher than that of controls; the difference observed was statistically significant for the last and penultimate SCC before the diagnosis of clinical mastitis.

Key words: bovine mastitis, somatic cell counts, clinical mastitis, microorganisms, subclinical mastitis

ÍNDICE GERAL

	Pág.
CAPÍTULO 1 — Introdução	1
1.1. Geral	1
1.2. Glândula mamária bovina.....	4
1.2.1. Imunidade inata ou não específica.....	4
1.2.2. Imunidade adquirida ou específica	8
1.3. Mastites bovinas	10
1.3.1. Fatores predisponentes.....	12
1.3.2. Diagnóstico	24
1.3.3. Terapêutica.....	30
1.4. Objetivos.....	32
CAPÍTULO 2 — Materiais e métodos.....	32
2.1. Caracterização da exploração	32
2.1.1. Práticas de manejo	34
2.1.2. Contagem de células somáticas	40
2.1.3. Mastites clínicas.....	43
2.2. Recolha de amostras de leite	44
2.3. Processamento laboratorial de amostras de leite.	50
2.4. Estudo caso-controlo: relação entre a CCS de casos de mastite clínica e de controlos	56
CAPÍTULO 3 — Resultados	57
3.1. Contagem de células somáticas	57
3.1.1. Caracterização estatística de CCS.....	57
3.1.2. Utilização da CCS como forma de aferição do estatuto de IIM de cada vaca.....	58
3.2. Mastites clínicas	61
3.3. Culturas microbiológicas.....	64
3.4. Estudo caso-controlo: relação entre a CCS de casos de mastite clínica e de controlos	67
CAPÍTULO 4 — Discussão	68
CAPÍTULO 5 — Conclusão	83
BIBLIOGRAFIA	85
ANEXOS	109
Anexo 1 — Poster submetido às XII Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, sob o tema «Mastites provocadas por <i>Prototheca</i> spp. numa exploração do Ribatejo».....	109
Anexo 2 — Entidades clínicas acompanhadas durante o estágio.....	111
Anexo 3 — Atividades desenvolvidas durante o estágio.	113
Anexo 4 — Classificação de mastites de acordo com a severidade	114

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
CAPÍTULO 1 — Introdução	
Figura 1.1. Recolha mundial de leite de vaca no ano de 2006.	1
Figura 1.2. Recolha de leite de vaca nos oito maiores países produtores da UE no ano de 2006.	2
Figura 1.3. Anatomia do úbere e do teto.	5
Figura 1.4. Mastites bovinas.	11
Figura 1.5. Projecção de leite dos tubos curtos de passagem do leite e/ou do coletor contra a extremidade distal dos tetos.	16
CAPÍTULO 2 — Materiais e métodos	
Figura 2.1. Estabulação livre: a) e b) vitelos lactentes; c) vitelas pós-desmame; d) novilhas.	34
Figura 2.2. Vacas em lactação estabuladas em sistema de <i>free stall barn</i>	35
Figura 2.3. Maternidade: a) zona interior; b) zona exterior no verão, após madrugada chuvosa.	36
Figura 2.4. Salas de ordenha: a) sala A; b) sala B.	36
Figura 2.5. Grau de higiene dos animais à ordenha: a) vaca em lactação não recém-parida; b) vaca em lactação recém-parida.	37
Figura 2.6. Lavagem dos tetos e/ou dos úberes, no parque de espera da sala de ordenha, por meio de jatos de água de dispersão automática.	38
Figura 2.7. <i>Liner slip</i> (círculo).	39
Figura 2.8. Teto com anel visível na base.	39
Figura 2.9. HEDT: a) teto sem anel de hiperqueratose (teto normal); b) teto com um anel liso ou de superfície ligeiramente rugosa; c) teto com anel rugoso; d) teto com congestão e anel muito rugoso.	39
Figura 2.10. <i>Post-dipping</i> com <i>Filmadine</i> ®.	40
Figura 2.11. Exemplo de resultados de contraste leiteiro.	45
Figura 2.12. Identificação dos copos de colheita.	46
Figura 2.13. Eliminação dos primeiros jatos de leite.	47
Figura 2.14. TCM.	47
Figura 2.15. <i>Pre-dipping</i> com <i>Prefoam</i> ®.	48
Figura 2.16. Secagem do teto com um pano.	48
Figura 2.17. Desinfecção do teto com um pedaço de algodão embebido em álcool a 70 %.	49
Figura 2.18. Recolha de amostra de leite para frasco de colheita esterilizado.	49
Figura 2.19. Acondicionamento de amostras de leite numa mala térmica.	50
Figura 2.20. Inoculação de amostra de leite em agar Columbia.	50
Figura 2.21. Agar Columbia: a) cultura pura com α -hemólise; b) cultura mista; c) cultura contaminada.	50
Figura 2.22. Colónias bacterianas isoladas em agar Columbia.	52
Figura 2.23. Cocos de Gram positivo (coloração Gram, x 1000).	52
Figura 2.24. Teste da catalase: a) reação positiva; b) reação negativa.	53
Figura 2.25. Teste da coagulase: a) reação positiva; b) reação negativa.	52
Figura 2.26. Teste da esculina: a) reação positiva; b) reação negativa.	54
Figura 2.27. Teste de CAMP: a) reação positiva; b) reação negativa.	54
Figura 2.28. Colónias lactose positivas em agar MacConkey.	55
Figura 2.29. Algas do género <i>Prototheca</i> (preparação a fresco com azul de algodão, x 1000).	55
Figura 2.30. Identificação presuntiva de agentes causais de mastite bovina.	56

CAPÍTULO 3 — Resultados

Figura 3.1. Média anual de CCSLT e CCSLT mensais determinadas com base na média mensal de CCSVI.	58
Figura 3.2. Percentagem mensal de vacas com e sem IIM.	59
Figura 3.3. Percentagem mensal de vacas com IIM crônicas, recentes, auto-cura de infecções recentes e sem infecção.	60
Figura 3.4. Resultados de secagem de vacas.	60
Figura 3.5. Incidência mensal de casos de mastite clínica.	62
Figura 3.6. Incidência de casos de mastite clínica por lactação.	62
Figura 3.7. Incidência de casos de mastite clínica por lactação, no período entre 1 de janeiro e 16 de março.	63
Figura 3.8. Incidência de casos de mastite clínica ao longo da lactação (ano de 2008).	64

ÍNDICE DE TABELAS**Pág.****CAPÍTULO 1 — Introdução**

Tabela 1.1. Relação da contagem de células somáticas de leite de tanque (CCSLT) com a prevalência de IIM e com a produção de leite.	3
Tabela 1.2. Concentração de Ig (mg/dl) no soro sanguíneo e na glândula mamária bovina.	10
Tabela 1.3. Principais benefícios dos micronutrientes para a saúde da glândula mamária.	14
Tabela 1.4. Agentes etiológicos de mastite bovina.	18

CAPÍTULO 2 — Materiais e métodos

Tabela 2.1. Número de vacas (em lactação e secas) existentes na exploração no mês de Janeiro de 2007, de 2008 e de 2009.	33
---	----

CAPÍTULO 3 — Resultados

Tabela 3.1. Taxa de mastites, percentagem do efetivo afetado e taxa de recorrência.	61
Tabela 3.2. Taxa de mastites, percentagem do efetivo afetado e taxa de recorrência no período entre 1 de janeiro e 16 de março.	61
Tabela 3.3. Resultados do processamento laboratorial de amostras de leite de casos de mastite subclínica.	65
Tabela 3.4. Micro-organismos identificados nas culturas mistas de casos de mastite subclínica.	65
Tabela 3.5. Resultados do processamento laboratorial de amostras de leite de casos de mastite clínica.	66
Tabela 3.6. Micro-organismos identificados de culturas mistas de casos de mastite clínica.	67
Tabela 3.7. Distribuição dos pares caso-controlo por lactação antes do diagnóstico de mastite clínica.	67
Tabela 3.8. Caracterização estatística da variação, em dias, entre a data de partos de casos e de controlos.	68
Tabela 3.9. Caracterização estatística das CCS de casos e de controlos antes do diagnóstico de mastite clínica.	68

ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BEN	Balanço energético negativo
BAMN	Bovine Alliance on Management and Nutrition
BRSV	Vírus da doença respiratória sincicial bovina
BVD	Diarreia viral bovina
CBT	Contagens bacterianas totais
CS	Células somáticas
CCS	Contagem de células somáticas
CCS (▲)	Última CCS antes do diagnóstico de mastite clínica
CCS (■)	Penúltima CCS antes do diagnóstico de mastite clínica
CCS (◆)	Antepenúltima CCS antes do diagnóstico de mastite clínica
CCSLT	Contagem de células somáticas de leite de tanque
CCSVI	Contagem de células somáticas de vacas individuais
HEDT	Hiperqueratose da extremidade distal do teto
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
ID	Número de identificação do animal
IDF	International Dairy Federation
Ig	Imunoglobulinas
IIM	Infeção intramamária
IMáxMC	Incidência máxima de mastites clínicas
IMC	Incidência de mastites clínicas
IMédMC	Incidência média de mastites clínicas
IMínMC	Incidência mínima de mastites clínicas
INE	Instituto Nacional de Estatística
NaGase	N-acetil- β -D-glucosaminidase
NMC	National Mastitis Council
NRC	National Research Council
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI-3	Parainfluenza tipo 3
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
pp	Ponto percentual
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos
T. B.	Teor butiroso

TCM	Teste californiano de mastites
TMR	<i>Total mix ration</i>
T. P.	Teor proteico
UE	União Europeia
ufc	Unidades formadoras de colónias
WHFF	World Holstein-Friesian Federation
25 UE	25 estados membros da União Europeia
\bar{x}	Média
σ	Desvio padrão

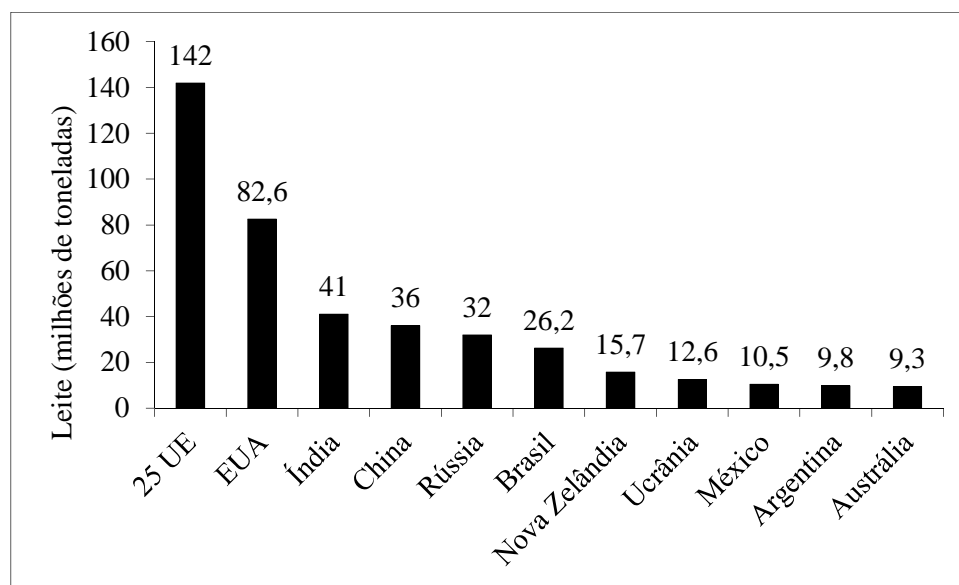
CAPÍTULO 1 — Introdução

1.1. Geral

O leite é considerado um alimento de elevado valor nutricional na dieta humana, devido à riqueza da sua composição, particularmente em energia, proteínas e minerais. Os bovinos, sobretudo da raça *Holstein Friesian*, devido às suas grandes dimensões e à grande capacidade de produção de leite, muito superior à que é necessária para alimentar um vitelo, são a espécie animal que providencia a maioria do leite, que se encontra disponível no mundo, para o consumo humano. A seleção genética; as melhorias na alimentação, nos alojamentos e em outros fatores de manejo; e os avanços tecnológicos no sector da produção de leite, nomeadamente nas máquinas de ordenha, a que se tem assistido ao longo dos anos, fizeram com que se obtivesse um animal que é atualmente uma verdadeira «máquina biológica». Hoje em dia, em explorações com uma boa genética e um bom manejo, é possível existirem vacas com uma produção acima dos 20 000 kg de leite por lactação (Weimer, 2001; Wagner-Storch & Palmer, 2003; Nunes, 2004; Ouweltjes, Beerda, Widing, Calus & Veerkamp, 2007; Oltenacu & Broom, 2010).

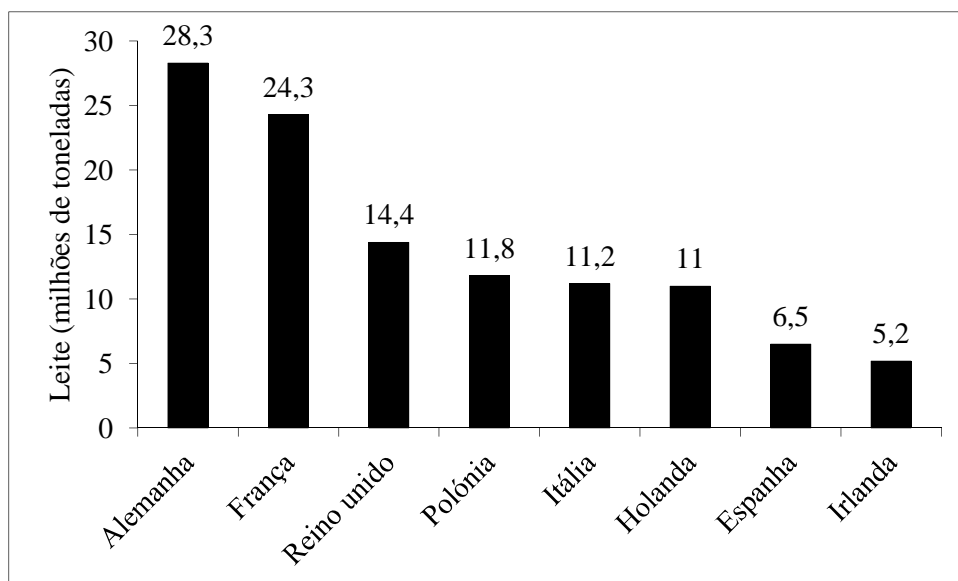
Entre 1996 e 2006, a produção mundial de leite de vaca aumentou cerca de 17,2 %. Para este aumento em muito contribuíram países como a China, a Índia, a Argentina, o Brasil, o México e os EUA (More, 2009). Nas figuras 1.1. e 1.2. encontram-se expressas as distribuições mundial e europeia da produção de leite de vaca no ano de 2006, respetivamente. Para o mesmo período, Portugal apresentou uma produção de cerca de dois milhões de toneladas de leite de vaca (Instituto Nacional de Estatística [INE], 2009).

Figura 1.1. Recolha mundial de leite de vaca no ano de 2006 (Adaptado de More, 2009).



25 UE — 25 estados membros da União Europeia;

Figura 1.2. Recolha de leite de vaca nos oito maiores países produtores da UE no ano de 2006 (Adaptado de More, 2009).



A seleção genética para a produção de leite, embora tenha possibilitado a criação de vacas altamente eficientes sob o ponto de vista produtivo, tem permitido também a obtenção de animais mais vulneráveis a uma série de afeções, como, por exemplo, às mastites. Esta afeção está intimamente associada à produção de leite, devido ao facto de se lidar com seres vivos com elevado potencial produtivo, submetidos constantemente a *stress* metabólico, em virtude de serem explorados até ao extremo limite das suas capacidades. Consequentemente, a glândula mamária bovina, cujas defesas são manifestamente insuficientes para contrariar a pressão imunológica a que está sujeita, tornou-se um órgão extremamente sensível (Ouweltjes et al., 2007).

As mastites bovinas constituem um dos mais importantes problemas sanitários que o médico veterinário e o produtor de leite têm de fazer face nas suas explorações. É a doença mais frequente (Meek et al., 1986); e com maior impacto económico (Sischo et al., 1990; Kossaibati & Esslemont, 1997; Doherty & O'Grady, 2009) na produção de bovinos leiteiros; afeta a saúde e o bem-estar animal; a imagem de mercado; a rentabilidade; e, em última análise, a qualidade de vida dos produtores (Doherty & O'Grady, 2009).

As mastites afetam o rendimento económico de uma exploração por duas vias: custos diretos e custos indiretos. Os custos diretos consistem em leite descartado, em assistência médico-veterinária e em medicamentos. Os custos indiretos estão relacionados com a diminuição da produção de leite, devido aos danos no úbere e/ou às infeções intramamárias (IIM) subclínicas (tabela 1.1.); com as penalizações relacionadas com o aumento do número de células somáticas (CS) e com a perda da qualidade do leite (Dohoo & Meek, 1982; Blowey &

Edmondson, 2010); com a necessidade de mão de obra extra para tratamento e cuidado dos animais doentes; com o aumento das taxas de refugo e de reposição, podendo levar à perda de potencial genético; e ainda com as possíveis mortes de animais (Blowey & Edmondson, 2010). Para vacas com contagens de células somáticas (CCS) acima das 50 000 células/ml de leite, calcula-se que as perdas na produção de leite sejam na ordem dos 0,5 kg/dia, se o valor das CS duplicar (Seegers, Fourichon & Beaudeau, 2003).

Tabela 1.1. Relação da contagem de células somáticas de leite de tanque (CCSLT) com a prevalência de IIM e com a produção de leite (Adaptado de National Mastitis Council [NMC], 1998).

CCSLT (ml de leite)	Quartos infectados (%)	Perdas na produção de leite ^(a) (%)
200 000	6	0
500 000	16	6
1 000 000	32	18
1 500 000	48	29

^(a) Perdas na produção de leite estimadas a partir das 200 000 CS/ml de leite de tanque

A extensão das alterações na composição do leite depende da patogenicidade do microrganismo invasor e da intensidade da resposta inflamatória. De uma forma geral, podem observar-se, entre outras, as seguintes modificações:

- diminuição ligeira ou aumento dos níveis de proteínas totais (NMC, 1998; Pyörälä, 2003; Park et al., 2007);
- diminuição da quantidade de caseína, principal proteína do leite (NMC, 1998; Pyörälä, 2003); e aumento da quantidade de proteínas plasmáticas, por exemplo, de albumina e de imunoglobulinas (Ig; NMC, 1998; Pyörälä, 2003; Batavani, Asri & Naebzadeh, 2007);
- diminuição do teor de lactose (NMC, 1998; Pyörälä, 2003; Park et al., 2007);
- diminuição do teor de gordura (NMC, 1998; Pyörälä, 2003; Park et al., 2007);
- alteração na concentração de sais minerais: diminuição da quantidade de cálcio, de magnésio, de fósforo, de zinco e de potássio (Pyörälä, 2003; Batavani, Asri & Naebzadeh, 2007); e aumento da quantidade de sódio e de cloro (NMC, 1998; Pyörälä, 2003; Batavani, Asri & Naebzadeh, 2007);
- aumento da concentração de enzimas proteolíticas, por exemplo, de plasmina, responsáveis pela degradação da caseína do leite (NMC, 1998; Ma et al. 2000; Pyörälä, 2003; Santos, Ma & Barbano, 2003); e de enzimas lipolíticas, por exemplo, de lípases, que causam a degradação da gordura do leite em ácidos gordos, e deste modo podem

contribuir para a rancificação do leite (Ma et al., 2000; Pyörälä, 2003; Santos, Ma & Barbano, 2003).

A perda da qualidade do leite inicia-se a partir das 100 000 CS/ml de leite (Barbano, Rasmussen & Lynch, 1991); e pode contribuir para a diminuição do seu prazo de validade, para alteração das suas propriedades organoléticas e, ainda, pode prejudicar o fabrico e a qualidade de determinados produtos, como, por exemplo, o queijo (Politis & Ng-Kwai-Hang, 1988; Barbano, Rasmussen & Lynch, 1991; Mazal, Vianna, Santos & Gigante, 2007) e os iogurtes (Oliveira et al., 2002; Fernandes, Oliveira & Lima, 2007).

Um estudo económico realizado por Huijps, Lam e Hogeveen (2008), em explorações leiteiras holandesas, mostrou que os custos de um caso de mastite clínica situaram-se em média nos 210 EUR. Em termos de mastites subclínicas, os custos variaram entre os 53 EUR/vaca e os 120 EUR/vaca, para CCSLT inferiores ou superiores às 100 000 e às 400 000 células/ml de leite, respetivamente. As perdas económicas totais (mastites clínicas e subclínicas), para uma exploração de 65 vacas, oscilaram entre os 114 EUR/vaca/ano e os 182 EUR/vaca/ano, consoante os valores de CCSLT fossem inferiores ou superiores às 100 000 e às 400 000 células/ml de leite, respetivamente. Ao nível da exploração, isto correspondeu a um prejuízo anual na ordem dos 7 453 EUR e dos 11 808 EUR, respetivamente.

1.2. Glândula mamária bovina

A glândula mamária é composta por quatro quartos independentes entre si (Nunes, 2004). Para contrapor a grande pressão imunológica a que está sujeita, encontra-se protegida por vários mecanismos de defesa. Podemos dividir este conjunto de defesas em duas categorias: imunidade inata ou não específica e imunidade adquirida ou específica (Sordillo & Streicher, 2002).

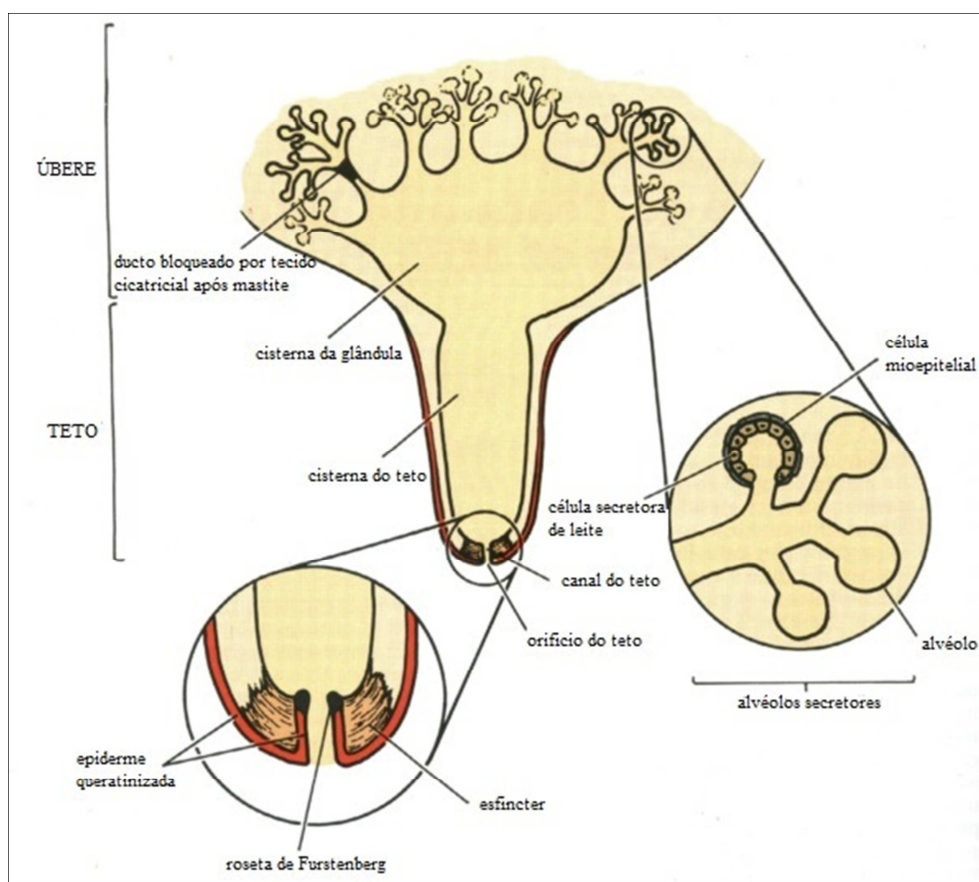
1.2.1. Imunidade inata ou não específica

Barreiras físicas

A pele do teto, o canal do teto e a extremidade distal do teto constituem as barreiras físicas de defesa da glândula mamária bovina. A pele do teto consiste numa camada espessa de epitélio escamoso estratificado queratinizado. O canal do teto é uma estrutura com cerca de 9 mm (5 a 13 mm) de comprimento (Blowey & Edmondson, 2010), com 2,3 a 5 mm de diâmetro (Seykora & McDaniel, 1985b) e internamente encontra-se revestido pelo mesmo tipo de

epitélio que o da pele dos tetos. O tampão de queratina, a roseta de *Furstenberg*¹ e o esfíncter são estruturas intimamente associadas ao canal do teto e fundamentais para o seu bom funcionamento (Blowey & Edmondson, 2010). O tampão de queratina funciona como uma barreira física, que impede a penetração de micro-organismos na glândula mamária. Para além disto, a queratina, devido à natureza da sua composição química, pode exercer também ações bacteriostática (Seykora & McDaniel, 1985b; Hogan, Pankey & Duthie, 1987; Capuco et al., 1992) e bactericida (Hogan et al. 1987; Capuco et al., 1992) sobre determinados agentes de mastite bovina. O canal do teto encontra-se fechado entre ordenhas e durante o período seco, e aberto durante a ordenha. Após a ordenha, são necessárias cerca de duas horas para que o esfíncter se contraia e cause o seu encerramento (Rainard & Riollet, 2006). A extremidade distal do teto é considerada a primeira linha de defesa contra a entrada de microrganismos na glândula mamária. Esta estrutura encontra-se envolvida por um esfíncter que contribui para o encerramento do orifício do teto entre ordenhas (figura 1.3.; Sordillo, Shafer-Weaver & DeRosa, 1997).

Figura 1.3. Anatomia do úbere e do teto (Adaptado de Blowey & Edmondson, 2010).



¹ situada na face superior interna do canal do teto, é um anel de células linfocíticas que é capaz de detetar a presença de agentes patogénicos, estimulando uma resposta imunitária (Blowey & Edmondson, 2010).

Células do leite

Quando os microrganismos conseguem ultrapassar as barreiras anatómicas de defesa, os leucócitos, presentes e recrutados para a glândula mamária, passam a ser os principais responsáveis por impedir o estabelecimento da infecção. Os leucócitos que estão associados a uma resposta imunitária não específica são os polimorfonucleares neutrófilos (PMN), os macrófagos e as células *natural killer* (Sordillo & Streicher, 2002).

Os PMN constituem a população celular predominante no colostro de vacas não infetadas (Kenny, Bastida-Corcovera & Norcross, 1992), no leite e no parênquima mamário durante a fase inicial de um processo inflamatório (Sordillo, Nickerson & Akers, 1989; Sordillo & Streicher, 2002; Paape, Bannerman, Zhao & Lee, 2003; Sarikaya, Schlamberger, Meyer & Bruckmaier, 2006), podendo constituir mais de 90 % do total de leucócitos da glândula mamária (Sordillo & Streicher, 2002; Pyörälä, 2003). Estas células são responsáveis pela fagocitose, pela destruição dos micro-organismos invasores e por fenómenos de quimiotaxia (Sordillo & Streicher, 2002; Paape et al., 2003).

Os macrófagos são a principal linha celular presente em glândulas mamárias não infetadas no período seco e durante a lactação (Kenny et al., 1992; Sordillo & Streicher, 2002; Pyörälä, 2003). Estas células, à semelhança dos PMN, participam na fagocitose, na destruição de agentes patogénicos (Kenny et al., 1992; Sordillo & Streicher, 2002) e na eliminação de restos celulares (Sordillo & Streicher, 2002). Para além disto, são ainda produtoras de citocinas (Schukken, Bennet, Green & van Werven, 2001) e funcionam como células apresentadoras de antígenos (Kenny et al., 1992; Sordillo & Streicher, 2002). As células *natural killer* são linfócitos grandes e granulares, dotados de citotoxicidade e de atividade antibacteriana, independentemente de uma sensibilização prévia contra o alvo (Garcia-Peñarrubia, Koster, Kelley McDowell & Bankhurs, 1989; Sordillo & Streicher, 2002).

Outros mecanismos de defesa

A lactoferrina é uma glicoproteína com capacidade de ligação e de transporte de iões ferro, podendo ser encontrada em diversas secreções epiteliais, fluidos corporais e nos grânulos dos PMN. O leite, de diversas espécies de mamíferos, por exemplo, dos humanos e dos ruminantes, é um dos tipos de secreções epiteliais em que esta proteína está presente (Hurley, Grieve, Magura, Hegarty & Zou, 1993; Levay & Viljoen, 1995). A lactoferrina é dotada não só de propriedades bacteriostáticas e bactericidas (Dionysius, Grieve & Milne, 1993; Komine et al., 2005), mas também imunomoduladoras (Levay & Viljoen, 1995; Komine et al., 2005), antivirais (Levay & Viljoen, 1995; Marr, Jenssen, Moniri, Hancock & Panté, 2009),

antifúngicas (Levay & Viljoen, 1995; Takakura et al., 2004), antitumorais (Iigo et al., 1999) e antiparasitárias (Cirioni, Giacometti, Barchiesi & Scalise, 2000). A concentração de lactoferrina no leite é baixa em úberes saudáveis e durante a lactação e é elevada no período seco (Hurley et al., 1993; Sorensen, Nørgaard, Theil, Vestergaard & Sejrsen, 2006) e na presença de mastite (Hurley et al., 1993).

A lactoperoxidase é uma enzima que pode ser encontrada nos seguintes órgãos ou células bovinas: nas células do epitélio da glândula mamária, na glândula salivar sublingual, na glândula lacrimal e nos leucócitos (Harada, Baba & Morikawa, 1973). A concentração desta enzima na glândula mamária é tanto maior quanto maior for a produção de leite. Para além disto, é capaz de exercer uma ação bacteriostática e bactericida sobre diversos agentes de mastite bovina. No entanto, a eficácia ou a magnitude deste tipo de ações está dependente de diversos fatores (Mickelson, 1966; Shin, Hayasawa & Lønnerdal, 2001; Sordillo & Streicher, 2002).

A transferrina é outro tipo de proteína com capacidade de ligação e de transporte de iões ferro, o que lhe pode conferir uma ação bacteriostática sobre determinados agentes de mastite bovina. Para além desta ação, também já foi descrito a possibilidade de ter algum poder bactericida (Ellison, LaForce, Giehl, Boose & Dunn, 1990). A transferrina, contrariamente à lactoferrina, não é sintetizada na glândula mamária bovina. A sua passagem da corrente sanguínea para o leite pode ocorrer por um processo de transcitose ou pode dever-se a um aumento da permeabilidade vascular na sequência de mastites (Rainard, Poutrel & Caffin, 1982; Sanchez et al., 1992). Neste último caso, a concentração de transferrina no leite tende a ser superior ao que é normal (Boehmer et al., 2010). A concentração de transferrina é muito mais baixa no leite do que no soro sanguíneo, e, ainda no leite, é mais baixa do que a de lactoferrina (Rainard et al., 1982).

A xantina oxidase é uma enzima que está presente no leite na forma livre (Briley & Eiselthal, 1974) e/ou associada à membrana dos glóbulos de gordura (Briley & Eiselthal, 1974; Mangino & Brunner, 1977), podendo ter propriedades antimicrobianas (Hancock et al., 2002). A lisozima é uma enzima hidrolítica que foi identificada pela primeira vez em 1922 por Alexander Fleming em secreções nasais. Para além desta localização, também já foi encontrada no interior dos leucócitos, em diversos tecidos (tecido cartilágneo, tecido fibroso, tecido adiposo, etc.) e fluidos corporais (lágrimas, saliva, leite, sangue, líquido peritoneal, etc.) de muitas espécies animais (Fleming, 1922), e em diversas espécies de plantas (Fleming, 1922; Sakthivel, Karthikeyan & Palani, 2010). A clara de ovo é o produto natural mais rico nesta proteína (Wilcox Jr. & Cole, 1956). A lisozima, apesar das propriedades antivirais (Lee-Huang et al., 1999), antiparasitárias (León-Sicairos et al., 2006) e antifúngicas (Wu,

Samaranayake, Leung & Sullivan, 1999), é reconhecida pelas suas propriedades bactericidas, sobretudo sobre bactérias de Gram positivo (Vakil, Chandan, Parry & Shahani, 1969). No entanto, o leite de vaca, comparativamente ao leite humano, apresenta uma baixa concentração nesta enzima, o que a torna um fator de defesa pouco relevante na glândula mamária bovina (Chandan, Parry Jr. & Shahani, 1968).

O sistema de complemento é a designação coletiva de um conjunto de proteínas que estão intimamente envolvidas em fenómenos de inflamação que podem ser por imunidade inata ou por imunidade adquirida. Estas proteínas, que podem estar presentes no soro sanguíneo e no leite (Sordillo et al. 1997), são sintetizadas sobretudo no fígado, contudo, há também a possibilidade de serem produzidas por outros tecidos (Marsh, Zhou & Sacks, 2001). No leite, o complemento está associado a atividades bactericidas (Hogan, Todhunter, Smith & Schoenberger, 1989c), hemolíticas (Mueller, Carroll & Panico, 1983), à opsonização de micro-organismos (Rainard & Poutrel, 1995), e ao recrutamento, preparação e ativação de células fagocíticas (Sethi, Tabel & Misra, 1990; Rainard, 2002). A concentração deste tipo de proteínas no leite é elevada no colostro e/ou na fase inicial da lactação, durante processos inflamatórios da glândula mamária, no final da lactação e no período seco, e é baixa durante praticamente toda a lactação (Kenny et al. 1992; Sordillo et al. 1997). O complemento, devido à sua presença intermitente no leite, é considerado um mecanismo pouco relevante na defesa da glândula mamária bovina.

Os anticorpos, ditos inatos, actuam sobretudo sobre antígenos *self* e são polirreactivos. Estes anticorpos podem encontrar-se no soro e no leite, são produzidos sem estimulação prévia por antígenos externos, e providenciam uma imediata e ampla proteção contra agentes patogénicos, antes do desencadear de uma resposta imunitária específica. A IgM é a principal classe de Ig dos bovinos envolvida em respostas imunitárias não específicas, embora qualquer classe de Ig possa atuar como anticorpo «natural» (Rainard & Riollot, 2006).

1.2.2. Imunidade adquirida ou específica

Imunidade celular ou mediada por células

A resposta imunitária celular ou mediada por células inicia-se quando as células apresentadoras de antígenos, como, por exemplo, os macrófagos e/ou os linfócitos B, os apresentam aos linfócitos T (Sordillo & Streicher, 2002).

A glândula mamária dos ruminantes encontra-se profundamente infiltrada por células linfóides (Lee, Meeusen & Brandon, 1989; Park, Fox, Hamilton & Davis, 1992). De uma forma geral, os linfócitos T são a principal população de células linfóides presentes em

glândulas mamárias não infectadas, sendo a restante constituída por linfócitos B e células *natural killer*. No entanto, a percentagem das várias linhas deste tipo de células, na glândula mamária, pode variar consoante a fase de lactação (Park et al., 1992), a localização tecidual (Lee et al., 1989), a existência ou não de IIM e o(s) agente(s) patogénico(s) envolvido(s) (Soltys & Quinn, 1999). Os linfócitos T podem dividir-se em linfócitos T $\alpha\beta$ e em linfócitos T $\gamma\delta$. Por sua vez, os linfócitos T $\alpha\beta$ podem subdividir-se em linfócitos CD4+ (linfócitos T-*helper*), em linfócitos CD8+ (linfócitos T-citotóxicos e linfócitos T-supressores; Soltys & Quinn, 1999).

Os linfócitos T-*helper* desempenham um importante papel na ativação tanto da imunidade celular como da imunidade humoral. Os linfócitos T-citotóxicos são responsáveis pela eliminação de células *self* alteradas, por exemplo, de células secretoras velhas ou danificadas cuja presença poderia aumentar a suscetibilidade dos animais para mastites. Os linfócitos T-supressores são responsáveis pelo controlo e modulação da resposta imunitária. As funções biológicas dos linfócitos T $\gamma\delta$ ainda não se encontram totalmente esclarecidas, contudo, há indícios de que confirmam proteção às superfícies epiteliais (Sordillo et al., 1997), de que possam funcionar como células apresentadoras de antígenos para os linfócitos T-*helper* (Sordillo et al. 1997; Collins et al., 1998) e de que possuam atividade citotóxica (Sordillo et al. 1997).

Imunidade humoral ou mediada por anticorpos

A resposta imunitária humoral depende da capacidade dos linfócitos B reconhecerem agentes patogénicos/antígenos específicos. Após a ativação dos linfócitos B, eles diferenciam-se em dois tipos de células: células efectoras produtoras de anticorpos, denominadas de plasmócitos, e células memória (Matias & Martins, 2005). Os anticorpos, também designados de Ig, são proteínas capazes de opsonizarem agentes patogénicos, de promoverem a neutralização direta de vírus e/ou de toxinas (Mallard et al., 1998), de prevenirem a adesão bacteriana às células epiteliais, de provocarem a lise direta de micro-organismos (Kenny et al., 1992), de ativarem o complemento e de facilitarem a depuração de antígenos (Mallard et al., 1998). Nos bovinos são conhecidas quatro classes de Ig: IgA, IgE, IgG e IgM. A IgG encontra-se, por sua vez, subdividida em duas subclasses, a IgG1 e a IgG2 (Kenny et al., 1992). As Ig que têm um papel na defesa da glândula mamária contra IIM são a IgG1, a IgG2, a IgM e a IgA (tabela 1.2.; Guidry & Miller, 1986).

Tabela 1.2. Concentração de Ig (mg/dl) no soro sanguíneo e na glândula mamária bovina (Adaptado de Kenny et al., 1992).

	IgG ₁	IgG ₂	IgM	IgA
Soro	11,2	9,2	3,0	0,37
Colostro	48,2	4,0	7,1	4,6
Leite	0,5	0,06	0,08	0,08

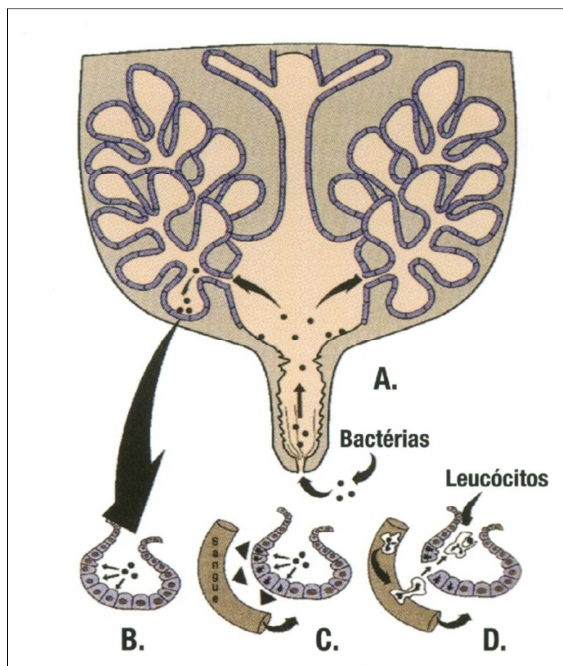
1.3. Mastites bovinas

O termo mastite (do grego *mastos*, que significa «mama», e *itis*, que significa «inflamação de») ou mamite (do latim *mamae*, que significa «mama», e *ite*, que significa «inflamação de») refere-se a uma reação inflamatória da glândula mamária independentemente da causa. Contudo, em bovinos está quase sempre associada à presença de microrganismos patogênicos (NMC, 1998; International Dairy Federation [IDF], 1999; Radostitis, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007).

De uma forma geral, o aparecimento de mastites bovinas pode ser dividido em três fases: invasão, infecção e inflamação (figura 1.4.). A invasão consiste na entrada de microrganismos, pela extremidade distal do teto, na glândula mamária. A infecção caracteriza-se pela adesão, rápida multiplicação e/ou disseminação dos microrganismos pela glândula mamária. Após a entrada na glândula mamária, os agentes patogênicos podem ficar circunscritos ao canal do teto ou, caso consigam ultrapassar esta barreira natural, podem atingir a cisterna do teto, a cisterna da glândula e/ou o parênquima mamário. Na fase inicial da infecção, os mecanismos de defesa inatos da glândula mamária atuam no sentido de debelar imediatamente a infecção. Se estes forem ineficazes, é então desencadeada uma resposta inflamatória. Os leucócitos e as células epiteliais dos quartos infetados libertam e/ou estimulam a libertação de mediadores inflamatórios com objetivo de atraírem mais leucócitos para o local de infecção. Dependendo do agente patogénico envolvido, as primeiras manifestações de inflamação podem surgir entre as três e as quatro horas após infecção. Se os PMN migrarem rapidamente até ao local de infecção e forem capazes de eliminar o estímulo inflamatório, o seu recrutamento cessa, as CS retornam aos valores normais e a reação inflamatória é ligeira. Se isto não se verificar, a reação inflamatória mantém-se devido ao contínuo influxo de PMN para o local de infecção e, consequentemente, as CS permanecem elevadas durante mais tempo. Uma resposta inflamatória prolongada no tempo provoca lesões graves no parênquima da glândula mamária, que se traduz por uma diminuição da quantidade e da qualidade do leite produzido (Lohuis,

Schukken, Verheijden, Brand & Van Miert; 1990; Kehrl, Jr. & Shuster, 1994; Radostitis et al. 2007).

Figura 1.4. Mastites bovinas (Adaptado de NMC, 1998).



- A) Entrada de bactérias na glândula mamária através do canal do teto;
- B) aderência de bactérias às células epiteliais secretoras de leite;
- C) toxinas produzidas pelas bactérias (setas pequenas) provocam a morte ou a lesão das células epiteliais secretoras de leite, e estas libertam mediadores inflamatórios (setas grandes) para a corrente sanguínea que causam o aumento da permeabilidade capilar;
- D) diapedese.

Em termos de sintomatologia, a IIM pode ser leve e indetetável, ou pode ser acompanhada por sinais clínicos óbvios. Estes sinais podem ser locais (alteração do leite e/ou da glândula mamária) e/ou sistêmicos. As principais alterações macroscópicas que podem ser observadas no leite são o leite demasiadamente aquoso ou viscoso; de cor amarelada (sem ser colostro); com coágulos de fibrina, com pus e/ou com sangue; e o odor, dependendo do(s) agente(s) envolvido(s), pode ser extremamente desagradável. Para além disto, há ainda uma quebra na produção e na qualidade do leite. O(s) quarto(s) infetado(s), numa fase inicial, podem apresentar-se tumefactos, ruborizados e, por palpação, dolorosos, firmes, enfisematosos e/ou mais quentes do que o normal ou, no caso de mastites gangrenosas, frios. Numa fase crónica pode ocorrer a formação de abscessos e a atrofia dos quartos infetados. Os sinais clínicos sistêmicos surgem devido à presença de mediadores inflamatórios e/ou de toxinas em circulação e podem traduzir-se por toxémia, febre, anorexia, taquicardia, estase ruminal,

prostração, decúbito lateral, desidratação, redução significativa da produção de leite, etc. (Rosenberg, Gerrit & Roy, 1979; NMC, 1998; Radostitis et al. 2007).

De acordo com o grau de inflamação as mastites podem classificar-se (IDF, 1999):

- a) subclínica: inflamação da glândula mamária que não é visível e requer testes de diagnóstico para a sua detecção. O teste de diagnóstico mais utilizado é a CCS;
- b) clínica aguda: processo inflamatório da glândula mamária caracterizado pela presença de sinais clínicos locais, como, por exemplo, alterações macroscópicas do leite, muitas vezes acompanhadas por tumefação dos quartos afetados; e ausência de sinais sistêmicos de doença;
- c) clínica hiperaguda: processo inflamatório da glândula mamária que se estabelece rapidamente, geralmente acompanhado por sinais clínicos sistêmicos e locais graves;
- d) crónica: surge quando as mastites clínicas ou subclínicas, refratárias à terapêutica, prolongam-se no tempo. As mastites crónicas caracterizam-se por grandes alterações do parênquima mamário e podem permanecer indefinidamente sob a forma subclínica ou alternar entre formas subclínicas e clínicas.

1.3.1. Fatores predisponentes

As mastites bovinas são uma doença multifatorial, em cuja génese intervém múltiplos fatores: o animal, o ambiente e/ou o manejo, a nutrição, a ordenha e os microrganismos (Radostitis et al., 2007).

Animal

As vacas mais velhas (com maior número de lactações ou de partos; Zadoks et al., 2001; Breen, Green & Bradley, 2009), com úberes profundos² (baixos; Rogers, Banos, Nielsen, & Philipsson, 1998; Compton, Heuer, Parker & McDougall, 2007b), com más pontuações de higiene (Compton et al., 2007b; Breen et al., 2009), com lesões nos tetos e/ou na extremidade distal dos tetos (Myllys, Honkanen-Buzalski, Virtanen, Pyörälä & Müller, 1994; Zadoks et al., 2001; Breen et al., 2009), com IIM prévias (Zadoks et al., 2001; Berry & Meaney, 2005; Compton et al., 2007b), submetidas constantemente a situações de *stress* (Weber et al., 2004; Corbett, 2009) e com elevado potencial genético para a produção de leite (Carlén, Strandberg, & Roth, 2004) tendem em apresentar uma maior suscetibilidade ou incidência de IIM.

²a profundidade do úbere é a distância que vai da parte mais baixa do úbere («chão» do úbere) ao curvilhão (World Holstein-Friesian Federation [WHFF], 2005).

Outros fatores inerentes ao animal que poderão influenciar a incidência de IIM são o período produtivo (período seco versus período de lactação; Ward & Schultz, 1974; Smith, Todhunter & Schoenberger, 1985), as características morfológicas dos tetos (Seykora & McDaniel, 1985a; Seykora & McDaniel, 1985b; Chrystal, Seykora & Hansen, 1999; Chrystal et al., 2001; Neijenhuis, Barkema, Hogeveen & Noordhuizen, 2001; Sousa, 2008) e a raça (Elbers et al., 1998; Compton et al., 2007b). Os bovinos são extremamente suscetíveis para novas IIM durante os períodos de transição da glândula mamária, isto é, da lactação para o período seco e do período seco para a lactação (das duas ou três semanas pré-parto até às duas ou três semanas pós-parto; Ward & Schultz, 1974; Smith et al., 1985). As características físicas dos tetos e dos úberes têm uma hereditariedade moderada-alta (Seykora & McDaniel, 1985b), e muitas delas podem estar relacionadas com uma maior ou menor predisposição dos animais para IIM. O comprimento e o diâmetro do teto; o grau de tensão do esfíncter; e a forma da extremidade distal do teto constituem exemplos destas características que podem influenciar a incidência de mastites (Seykora & McDaniel, 1985a; Chrystal et al., 1999; Chrystal et al., 2001; Neijenhuis et al., 2001; Sousa, 2008). No entanto, para muitas delas, não existe um consenso claro na literatura quanto ao papel que podem ter no aumento ou na diminuição da predisposição dos animais para IIM.

Ambiente e/ou manejo

A localização geográfica das explorações pode influenciar a incidência de IIM, devido, por exemplo, às variações climáticas que podem surgir ao longo do ano (Waage, Sviland & Ødegaard, 1998; Waage et al., 1999).

As vacas de leite, um pouco por todo o mundo, podem ser mantidas em diferentes tipos de sistema: na pastagem; em parques ao ar livre; em estábulos cobertos em sistema de *free stall barn* (estabulação livre com cubículos), em sistema de *tie stall barn* (animais presos aos respetivos cubículos) ou em sistema de *straw yard* (estabulação livre com camas de palha). O tipo de sistema ou de alojamento utilizado, a arquitetura e o manejo dos parques: o nível de ventilação; as dimensões e o grau de higiene dos parques (dos cubículos, dos corredores de passagem, das áreas de exercício e de espera), o conforto dos cubículos, o tipo de material de cama utilizado, a existência de maternidade ou de enfermaria e as características destas, a densidade animal e o plano de circulação das vacas são tudo fatores que podem influenciar a incidência de mastites. (Hogan et al., 1989a; Barkema et al., 1999; Hughes, 2000; Peeler, Green, Fitzpatrick, Morgan & Green, 2000; Huzzey, Veira, Weary & Keyserlingk, 2007; Driessen, 2009).

Nutrição

A alimentação tem um importante papel no fortalecimento do sistema imunitário. As quantidades desajustadas de alimento e/ou níveis inadequados de qualquer nutriente podem afetar negativamente a imunidade do animal e, conseqüentemente, a da glândula mamária. Deste modo, torna-se imprescindível fornecer diariamente às vacas um alimento adequado não só em quantidade, mas também em termos nutricionais, isto é, adaptado às diferentes idades e fases do ciclo produtivo. Há micronutrientes e vitaminas que desempenham um importante papel na saúde da glândula mamária, tais como o selênio (Smith, Harrison, Hancock, Todhunter & Conrad, 1984; Weiss, Hogan, Smith & Hoblet, 1990), o cobre (Scaletti, Trammell, Smith & Harmon, 2003; Scaletti & Harmon, 2012), o zinco (Cope, Mackenzie, Wilde & Sinclair, 2009) e as vitaminas A (Chew, Hollen, Hillers & Herlugson, 1982) e E (Smith et al., 1984; Weiss et al., 1990; tabela 1.3.)

Tabela 1.3. Principais benefícios dos micronutrientes para a saúde da glândula mamária (Adaptado de Sordillo et al., 1997).

Micronutrientes	Observações
Selênio	<ul style="list-style-type: none"> - deficiências na dieta resultam na redução das capacidades funcionais dos PMN; - melhora as capacidades bactericidas dos PMN; - diminui a gravidade e a duração dos episódios de mastite.
Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> - aumenta a atividade bactericida dos PMN; - diminui a incidência de mastites clínicas; - em combinação com o selênio diminui a prevalência de IIM ao parto.
Vitamina A	<ul style="list-style-type: none"> - diminui a CCS; - regula os níveis de glucocorticoides.
β -caroteno	<ul style="list-style-type: none"> - aumenta a atividade bactericida das células fagocíticas; - estimula a proliferação de linfócitos.
Cobre	<ul style="list-style-type: none"> - deficiências na dieta contribuem para a diminuição das capacidades bactericidas dos PMN e aumentam a suscetibilidade dos animais para infecções bacterianas.
Zinco	<ul style="list-style-type: none"> - deficiências na dieta diminuem a actividade dos leucócitos e aumentam a susceptibilidade dos animais para infecções bacterianas.

Ordenha

A ordenha deve ser realizada num ambiente limpo e calmo, com procedimentos adequados; por uma máquina em bom estado de funcionamento; e por pessoas responsáveis, treinadas e conscienciosas, para se minimizar o risco de IIM e maximizar a produção de um leite de qualidade (NMC, n. d. 4).

A ordem de ordenha, a frequência de ordenha, o número de ordenhadores, a forma como as vacas são conduzidas para a ordenha, os procedimentos de ordenha e a forma como estes são executados pelo ordenhador: a utilização de luvas, a lavagem dos tetos, a inspeção do úbere e a eliminação dos primeiros jatos de leite, a desinfecção dos tetos antes da ordenha, a secagem dos tetos, a forma como as unidades de ordenha são colocadas e removidas, a desinfecção das tetinas entre vacas durante a ordenha e a desinfecção dos tetos após a ordenha, constituem fatores que podem afetar a disseminação de IIM numa exploração (Jones & Ohnstad, 2002; Smith, Ely, Graves & Gilson, 2002; Dahl, Wallace, Shanks & Lueking, 2004; Ohnstad, 2005; NMC, n. d. 4; Blowey & Edmondson, 2010).

A eliminação dos primeiros jatos de leite apresenta as seguintes vantagens (Jones & Ohnstad, 2002; Blowey & Edmondson, 2010):

- a) melhora a capacidade de deteção de mastites, o que permite evitar que leite com elevadas CCS e contagens bacterianas entre no tanque de leite; e possibilita o tratamento precoce de casos de mastite clínica, o que favorece o aumento das taxas de cura e a redução da disseminação de agentes patogénicos dentro da exploração;
- b) favorece a eliminação de restos de leite e de micro-organismos que tenham ficado retidos no canal do teto, após a última ordenha;
- c) estimula o reflexo de descida do leite;
- d) permite detetar lesões nos tetos.

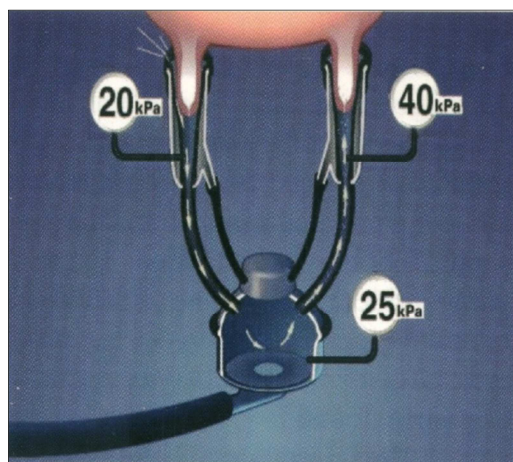
O *pre-dipping* é a desinfecção dos tetos antes da ordenha, por imersão numa solução contendo um agente antiséptico e, muitas vezes, um agente hidratante e uma substância detergente. O *post-dipping* consiste na desinfecção dos tetos imediatamente após a ordenha, por imersão numa solução capaz de, idealmente providenciar uma tripla ação: uma ação desinfetante contra os micro-organismos que, eventualmente possam ter sido transferidos para a pele do teto durante a ordenha e/ou que possam existir no canal do teto; uma ação tópica cujo objetivo é limitar os danos na pele do teto e, idealmente, permitir a hidratação e reestruturação da epiderme; e uma ação oclusiva, que consiste em obstruir o canal do teto com um produto tampão, até à próxima ordenha. O *teat spraying* é uma alternativa à desinfecção dos tetos por

imersão. Os resultados com esta modalidade de desinfecção podem ser também bastante satisfatórios desde que o *spray* seja corretamente aplicado em toda a superfície dos tetos. (Jones & Ohnstad, 2002; Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 4; Benevides, observações pessoais).

A máquina de ordenha é também considerada um fator de risco para mastites, porque atua como fomite; pode gerar forças de impacto (Edmondson, 2001; Blowey & Edmondson, 2010); pode estar associada ao aparecimento de lesões na extremidade distal dos tetos (Neijenhuis, Barkema, Hogeveen & Noordhuizen, 2000; Edmondson, 2001; Blowey & Edmondson, 2010), a um aumento da colonização bacteriana na extremidade distal dos tetos e/ou do canal do teto, a subordenha, a sobreordenha (Edmondson, 2001; Blowey & Edmondson, 2010); e, ainda, pode ser uma possível fonte de choques elétricos (Blowey & Edmondson, 2010).

As forças de impacto consistem na projeção de leite dos tubos curtos de passagem do leite e/ou do coletor contra a extremidade distal dos tetos. Este fenómeno ocorre quando existe uma diferença de pressão entre a extremidade do teto e a unidade de ordenha. Esta diferença de pressão necessita apenas de uns milisegundos para causar impacto. A velocidade com que o leite é projetado contra a extremidade distal do teto é bastante elevada (cerca de 60 km/h), podendo, por isto, ocorrer penetração deste pelo canal do teto (Figura 1.5.). A remoção das unidades de ordenha sem desligar primeiro o vácuo, a realização de *machine stripping*³ ou a ocorrência de *liner slip*, são condições que contribuem para ocorrência de forças de impacto na extremidade dos tetos (Edmondson, 2001; Blowey & Edmondson, 2010).

Figura 1.5. Projeção de leite dos tubos curtos de passagem do leite e/ou do coletor contra a extremidade distal dos tetos (Adaptado de Lévesque, 2004).



³ é uma prática, que alguns ordenhadores têm tendência em executar no final da ordenha, que consiste em aplicar pressão com uma mão no coletor para baixo e com outra procede-se à massagem dos quartos em ordenha. Vulgarmente também é designado por repasse. Este processo é de todo desaconselhado (Jones & Ohnstad, 2002; Blowey & Edmondson, 2010).

O *liner slip* é um fenómeno que se caracteriza pelo deslizamento da tetina pela superfície do teto, e que se faz notar pela entrada audível ar (som do tipo *squawking*) pelo topo da tetina. Os fatores que podem predispor para esta condição, que se observa durante a ordenha, são as vacas com os tetos húmidos (Edmondson, 2001, NMC, n. d. 3) pequenos, muito compridos ou espalmados; as vacas nervosas que se mexem muito durante a ordenha (Blowey & Edmondson, 2010); a baixa pressão de vácuo (Edmondson, 2001; Ohnstad, 2005; Blowey & Edmondson, 2010); as grandes flutuações de vácuo (Edmondson, 2001; Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 3); a inadequada reserva de vácuo (Blowey & Edmondson, 2010); as tetinas mal concebidas, gastas ou deformadas (Edmondson, 2001; Ohnstad, 2005); um elevado peso do coletor (Edmondson, 2001; Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 3); o incorreto alinhamento da unidade de ordenha (Edmondson, 2001; Ohnstad, 2005) e a realização de *machine stripping* (Edmondson, 2001; Blowey & Edmondson, 2010).

Micro-organismos

Segundo alguns autores, mais de 200 micro-organismos diferentes encontram-se registados na literatura científica como causadores de mastite bovina (Blowey & Edmondson, 2010). A maioria dos casos de mastite são provocados por bactérias, contudo, outros micro-organismos — como as leveduras, os micoplasmas e as algas — podem também ocasionalmente causar IIM. Os vírus raramente são uma causa primária de mastite bovina (NMC, 1998). No âmbito deste trabalho, optou-se por fazer uma pequena abordagem aos agentes de mastite bovina mais comuns.

Os micro-organismos que normalmente provocam IIM em bovinos podem classificar-se, de acordo com a sua fonte (Harmon, 1994; Makovec & Ruegg, 2003; NMC, n. d. 1; NMC, n. d. 2) e o modo de transmissão (Harmon, 1994; Makovec & Ruegg, 2003), em agentes contagiosos e ambientais (tabela 1.4.); e de acordo com a severidade da IIM, as alterações na composição do leite, as consequências na produtividade da vaca e o impacto económico, em agentes «maiores» e «menores» (Rainard & Poutrel, 1988; Harmon, 1994).

Tabela 1.4. Agentes etiológicos de mastite bovina (Adaptado de NMC, 1999; NMC n. d. 1; NMC n. d. 2).

Agentes contagiosos	Agentes ambientais	Agentes contagiosos e ambientais
Mais comum		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus</i> «ambientais» <i>Enterococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN) <i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Prototheca</i> spp.
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Mycoplasma</i> spp. <i>Corynebacterium bovis</i>	Coliformes <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Enterobacter aerogenes</i>	
Menos Comum		
<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Bacilos</i> spp. Leveduras Fungos <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Nocardia</i> spp. <i>Mycobacterium</i> spp.

Os principais microrganismos contagiosos de mastite bovina são *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma* spp. Para além destes, temos ainda *Corynebacterium bovis* que é considerado um agente contagioso «menor» (NMC, 1998; NMC, n. d. 1).

A glândula mamária infetada é o principal reservatório destes micro-organismos (Harmon, 1994; Roberson, Fox, Hancock, Gay & Besser, 1998; NMC, 1999), no entanto, podem também ser encontrados na pele dos tetos, em outros órgãos/regiões corporais dos bovinos (Matthews, Harmon & Langlois, 1992; Roberson et al., 1998 NMC, 1999; Haveri, Hovinen, Roslöf & Pyörälä, 2008), nas narinas e nas mãos dos seres humanos (Matos, White, Harmon & Langlois, 1991; Haveri et al., 2008) e em algumas fontes ambientais das vacarias (Matos et al., 1991).

Estes agentes são transmitidos, através do canal do teto, de vacas/quartos infetados para vacas/quartos não infetados, principalmente durante a ordenha (Harmon, 1994; NMC, 1998; NMC, 1999; NMC, n. d. 1). No entanto, *Mycoplasma* spp., além do modo de transmissão referido, pode também a partir de outros focos de infeção do organismo disseminar-se por via hematogena para a glândula mamária (NMC, 1999; Tyler & Cullor, 2002; NMC, n. d. 1).

Os micro-organismos contagiosos estão bem adaptados ao úbere e normalmente provocam infeções que podem durar semanas, meses ou anos (NMC, n. d. 1). As explorações que têm uma elevada incidência de IIM por estes agentes, geralmente apresentam CCS elevadas e contagens bacterianas totais (CBT) normais. As explorações que só têm IIM por estes agentes, frequentemente apresentam uma baixa incidência de casos de mastite clínica (Blowey & Edmondson, 2010).

A prevenção e o controlo deste tipo de mastites devem ser feitos através da implementação do plano dos cinco pontos de controlo de mastites (Jones & Ohnstad, 2002; Hillerton & Berry, 2005; O'Rourke, 2009):

- a) tratamento imediato de todos os casos de mastite clínica;
- b) antibioterapia de secagem a todos os quartos, de todas as vacas, no final da lactação;
- c) refugo de todos os animais com IIM recorrentes/crónicas;
- d) *post-dipping*, imediatamente após a ordenha, a todos os quartos, de todas as vacas;
- e) revisão regular da máquina de ordenha (pelo menos uma vez por ano).

Um bom programa de controlo de qualidade do leite deve garantir que não existem no efetivo vacas infetadas por *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma* spp. e que apenas menos de 5 % delas se encontram infetadas por *Staphylococcus aureus* (NMC, n. d. 1).

Uma das principais alterações na epidemiologia das mastites bovinas, que se têm verificado nos últimos tempos, é a crescente importância dos agentes ambientais comparativamente aos contagiosos, sobretudo em termos de mastites clínicas. Atualmente, as mastites clínicas por agentes ambientais constituem um importante problema em explorações com bom maneio e baixas CCS (Radostitis et al., 2007; Hogan et al., 1989b; González et al., 1990).

Os principais micro-organismos ambientais de mastite bovina podem dividir-se em dois grupos:

- a) *Streptococcus* «ambientais» — *Streptococcus uberis*⁴, *Enterococcus* spp., etc.;
- b) coliformes — *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter aerogenes*.

De todos estes agentes, os mais importantes são *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (Peeler et al., 2000; O'Rourke, 2009; Blowey & Edmondson, 2010).

A principal fonte destes micro-organismos é o ambiente envolvente das vacarias (Harmon, 1994; NMC, 1999; Radostitis et al., 2007; Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 2). No entanto, os *Streptococcus* «ambientais» já foram também isolados de diversos órgãos ou

⁴ Atualmente também é considerado agente contagioso.

regiões corporais das vacas — de regiões genitais, dos lábios (NMC, 1999; Tyler & Cullor, 2002; Radostitis et al., 2007), da boca, das tonsilas (Radostitis et al., 2007), das narinas, dos tetos (Tyler & Cullor, 2002) e da pele das vacas (NMC, 1999; Tyler & Cullor, 2002).

Os agentes ambientais são transmitidos, sobretudo entre ordenhas, a partir do contacto dos tetos com fontes ambientais contaminadas (Harmon, 1994; Blowey & Edmondson, 2010), contudo, as vacas também podem infetar-se durante a ordenha, no período seco (Tyler & Cullor, 2002; Radostitis et al., 2007) e, no caso das novilhas, antes do parto (Radostitis et al., 2007). As explorações que têm uma elevada incidência de IIM por estes micro-organismos, normalmente apresentam CCS dentro de valores aceitáveis, mas um elevado número de casos de mastite clínica e elevadas CBT (Blowey & Edmondson, 2010).

A prevenção e o controlo de mastites por agentes ambientais têm por base a redução da exposição dos tetos aos agentes patogénicos e o aumento da resistência dos animais às IIM. Isto pode ser conseguido através da aplicação das seguintes medidas (NMC, n. d. 2):

- a) manutenção dos animais num ambiente limpo e seco;
- b) adequados procedimentos de ordenha. Por exemplo, limpeza e secagem dos tetos antes da ordenha; e realização de *pre-dipping* e *post-dipping*. Embora a eficácia do *post-dipping* no controlo de mastites por agentes ambientais, sobretudo por coliformes, seja limitada, é recomendável a sua utilização dado que tem algum efeito sobre *Streptococcus* «ambientais»;
- c) dieta equilibrada. A alimentação dos animais deve conter níveis adequados de vitaminas (A, E e β -caroteno) e de microelementos (selénio, cobre e zinco);
- d) imunização de vacas e de novilhas contra mastites por coliformes. A proteção conferida pela vacina não é total, no entanto, poderá contribuir para as reduções da incidência e da severidade dos casos de mastite clínica por coliformes, no efetivo leiteiro, durante a fase inicial da lactação;
- e) aplicação de um selante de tetos, em todos os quartos, no momento da secagem.

Os agentes «maiores» são aqueles que causam graves IIM; grandes alterações no aspeto e na composição do leite, no qual se inclui, entre outros, elevadas descargas celulares; quebras significativas na produção de leite; e elevados prejuízos económicos às explorações leiteiras. Os agentes «maiores» mais comuns de mastite bovina são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, coliformes e *Mycoplasma bovis*. Pelo contrário, as IIM por agentes «menores», SCN, *Corynebacterium bovis* e outras espécies do género *Corynebacterium*, raramente se fazem acompanhar pelas

consequências referidas acima (Rainard & Poutrel, 1988; Harmon, 1994; NMC, 1998; Hassan, Samarasinghe & Lopez-Benavides, 2009).

Para além de agentes «menores», SCN são também considerados agentes oportunistas de mastite bovina, porque fazem parte da microflora normal da pele do teto e do úbere, podendo ser isolados do orifício e do canal do teto (NMC, 1999). Para além destas localizações, podem ainda ser encontrados em outras regiões corporais das vacas (White, Harmon, Matos & Langlois, 1989), em diversas fontes ambientais das vacarias (NMC, 1999; Piessens et al., 2011) e na pele dos seres humanos (Thorberg et al., 2006).0000

A prevalência de IIM por SCN tende em ser mais elevada no pré-parto (Oliver & Mitchell, 1983), ao parto (Oliver & Mitchell, 1983; NMC, 1999), na fase inicial da lactação (Thorberg, Danielsson-Tham, Emanuelson & Waller, 2009) e em novilhas (NMC, 1999; George, Divers, Ducharme & Welcome, 2008; Thorberg et al., 2009). A(s) espécie(s) de SCN mais prevalente(s) pode(m) variar entre explorações, e entre novilhas e vacas múltiparas (Matthews et al. 1992; Thorberg et al. 2009).

Atualmente, o género *Staphylococcus* engloba 51 espécies (NCBI Taxonomy, 2014), cuja maioria são SCN. Os resultados de vários estudos têm mostrado uma grande variabilidade relativamente à(s) espécie(s) de SCN mais frequentemente isolada(s) de casos ou de estudos de prevalência de mastites bovinas. No entanto, *Staphylococcus chromogenes* tem-se revelado como a principal espécie de SCN isolado da glândula mamária bovina. Para além desta, também têm sido isolados com alguma frequência deste tipo de estudos *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus xylosus*. Em menor frequência têm sido isolados *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus hycius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caseolyticus*, entre outros (Matthews et al. 1992; Aarestrup & Jensen, 1997; Taponen, Koort, Björkroth, Saloniemi & Pyörälä, 2007; Thorberg et al. 2009; Supré et al., 2011).

Estes agentes podem causar IIM transitórias (Matthews et al. 1992; NMC, 1999; Taponen et al., 2007) e persistentes (Taponen et al., 2007; Thorberg et al. 2009), e estão sobretudo associados a casos de mastite subclínica, no entanto, também já foram isolados de casos de mastite clínica (Matthews et al. 1992; NMC, 1999; Taponen et al., 2007; Thorberg et al. 2009). As vacas infetadas normalmente apresentam CCS mais baixas do que as infetadas por outras bactérias de Gram positivo (Taponen et al., 2007), todavia, e dependendo da(s) espécie(s) envolvida(s), podem também exibir elevadas descargas celulares, muitas vezes comparáveis às de vacas infetadas por *Staphylococcus aureus* (NMC, 1999; Taponen et al., 2007; Thorberg et al., 2009; Supré et al., 2011). Uma boa higiene durante a ordenha (por

exemplo, *pre-dipping* e secagem dos tetos antes da ordenha), o *post-dipping*, a antibioterapia de secagem (NMC, 1999; George et al., 2008) e a manutenção regular da máquina de ordenha (George et al., 2008), constituem exemplos de algumas medidas que podem ajudar no controlo deste tipo de IIM.

As algas do género *Prototheca*, embora no passado tenham sido apenas associadas a alguns casos esporádicos de mastite bovina, atualmente são consideradas uma causa emergente deste tipo de afeção (Roesler & Hensel, 2003; Ricchi et al., 2010). Estas algas são organismos unicelulares; da família *Chlorellaceae*; sem clorofila; saprófitas; ubiqüitárias (Pore, Barnett, Barnes & Walker, 1983); capazes de sobreviver ou de resistir a uma série de fatores, como, por exemplo, à pasteurização (Melville et al., 1999) e ao tratamento com quimioterápicos (Bexiga, Cavaco & Vilela, 2003) e com cloro (Pore et al., 1983); e responsáveis por causarem diversas afeções nos animais (Vaz, Carneiro, Wolff, Dick & Luciano, 2005; Bexiga et al., 2003; Souza et al., 2009) e no Homem, sobretudo em indivíduos imunodeprimidos; (Narita, Muder, Cacciarelli & Singh, 2008).

Em termos taxonómicos, encontram-se descritas na literatura seis espécies do género *Prototheca*: *Prototheca zopfii* (Buzzini et al., 2004; Marques, Silva, Carvalheira & Thompson, 2006; George et al., 2008), *Prototheca wickerhamii* (Marques et al., 2006; George et al., 2008) *Prototheca stagnora*, *Prototheca ulmea* (Roesler, Möller, Hensel, Baumann & Truyen, 2006; Marques et al., 2008), *Prototheca trispora* (George et al., 2008) e *Prototheca blaschkeae* (Roesler et al., 2006; Marques et al., 2008). Para além destas, há ainda quem considere *Prototheca moriformis* como uma espécie diferente das restantes, no entanto, esta classificação não é amplamente aceite (Roesler et al., 2006; Marques et al., 2008). Nos bovinos, *Prototheca zopfii* é a espécie mais frequentemente isolada de casos de mastite (Buzzini et al., 2004; Marques et al., 2006), todavia, também já foram isolados de úberes infectados *Prototheca wickerhamii* (Marques et al., 2006; George et al., 2008) *Prototheca trispora* (George et al., 2008) e *Prototheca blaschkeae* (Roesler et al., 2006; Marques et al., 2008).

Estes organismos unicelulares já têm sido isolados tanto de vacas (Malinowski, Lassa & Klossowska, 2002; Bexiga et al., 2003) como de muitas fontes ambientais de explorações de diversos países com e sem historial de IIM por *Prototheca* spp. (Anderson & Walker, 1988; Yamamura et al., 2008). Nos bovinos, estes agentes podem encontrar-se na glândula mamária, no leite e no interior de células (Malinowski et al., 2002; Roesler & Hensel, 2003), razão pela qual são muitas vezes eliminados em pequena quantidade ou de forma intermitente, prejudicando o diagnóstico. Para além desta localização, já foram recuperados de fezes (Pore

et al., 1983), de gânglios linfáticos, de cornos uterinos e de rins (González, 1996). No ambiente, estas algas podem encontrar-se no solo (González, 1996; Roesler & Hensel, 2003; Yamamura et al. 2008); nas plantas (González, 1996; Roesler & Hensel, 2003); nos estábulos e nas estruturas a eles associados (González, 1996; Scaccabarozzi et al., 2008); nos equipamentos de ordenha e afins (Scaccabarozzi et al., 2008); e em diversas fontes de água, quer nas que abastecem ou que possam existir nas explorações, quer nas águas dos mares, dos rios e dos lagos (Pore et al. 1983; González, 1996; Roesler & Hensel, 2003; Scaccabarozzi et al., 2008; Yamamura et al., 2008).

Estas algas, embora possam ser ingeridas, atingem a glândula mamária provavelmente por penetração pelo orifício e canal do teto (NMC, 1999). As vacas podem infetar-se entre ordenhas, a partir do contacto dos tetos com fontes ambientais contaminadas, ou durante a ordenha (NMC, 1999). As IIM por *Prototheca* spp. podem surgir de forma esporádica ou epidémica, em qualquer fase da lactação (Jánosi et al., 2001; Yamamura et al., 2008) e, ainda, podem persistir durante todo o período seco (Dion, 1982). No entanto, segundo os relatos de alguns autores, a incidência tende a ser mais elevada nas primeiras semanas de lactação e, dependendo das condições climáticas da região em que a exploração está inserida, no verão (Jánosi et al., 2001).

As IIM por *Prototheca* spp. podem resultar em mastites clínicas, subclínicas e crónicas. Os sinais clínicos que normalmente podem estar presentes são comuns aos de muitas outras mastites clínicas provocadas por outros microrganismos, e que já foram aqui descritos, à exceção de sinais de toxémia. Em termos de mastites subclínicas e crónicas podem observar-se uma diminuição da produção de leite, elevadas descargas celulares (Jánosi et al., 2001; George et al., 2008; Ricchi et al., 2010) e, histopatologicamente, sinais de mastite intersticial progressiva com atrofia alveolar (Jánosi et al., 2001).

In vitro, as algas do género *Prototheca* já demonstraram ser sensíveis a alguns agentes terapêuticos, nomeadamente a alguns antifúngicos (anfotericina B, nistatina [Malinowski et al., 2002; Bexiga et al., 2003], mixina [Bexiga et al., 2003] e pimaricina [Malinowski et al., 2002]) e antibióticos (gentamicina, neomicina, estreptomicina; [Malinowski et al., 2002], aminosidina e polimixina B [Bexiga et al., 2003]). No entanto, *in vivo*, continua a não haver nenhum tratamento médico com eficácia comprovada (NMC, 1999; Malinowski et al., 2002; Bexiga et al., 2003; Vaz et al., 2005; George et al., 2008) No anexo 1, encontra-se descrito um pequeno ensaio preliminar de tratamento de mastites provocadas por *Prototheca* spp., realizado por nós; e cujos resultados corroboram o que já foi demonstrado por outros. Por este motivo, a melhor forma de controlo de mastites por estes agentes consiste na identificação, na separação e no refugio dos animais infetados. Para além disto, a manutenção dos animais num

ambiente limpo e seco; a limpeza e a desinfecção regulares dos estábulos e estruturas afins; as boas práticas de ordenha; a correta limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha após a ordenha; a não alimentação de vitelos com leite contaminado por *Prototheca* spp.; e a não adubação dos solos com estrume, sobretudo nas situações em que as vacas são mantidas na pastagem, constituem exemplos de outras boas práticas que podem ser implementadas nas explorações para minimizar a ocorrência de mastites por estas algas (NMC, 1999; János et al., 2001; Malinowski et al., 2002; Bexiga et al., 2003; Vaz et al., 2005; George et al., 2008; Yamamura et al., 2008).

1.3.2. Diagnóstico

A monitorização da saúde do úbere e/ou o diagnóstico de IIM são assegurados por uma grande variedade de técnicas de diagnóstico. A CCS e a cultura microbiológica são as mais frequentemente utilizadas (NMC, 1998; Mason, 2005; Lam, Olde Riekerink, Sampimon & Smith, 2009). Para além destas, o exame físico do quarto ou da glândula infectada (NMC, 1998; Lam et al., 2009); os testes moleculares (por exemplo, a *polymerase chain reaction* [PCR]; Zadoks & Schukken, 2006; Lam et al., 2009); a condutividade elétrica do leite (Milner, Page, Walton & Hillerton, 1996; NMC, 1998; Lam et al., 2009); a quantificação dos níveis de determinadas enzimas no leite (por exemplo, a N-acetil- β -D-glucosaminidase [NAGase]; Pyörälä & Pyörälä, 1997; NMC, 1998; Lam et al., 2009); a pesquisa de anticorpos ou de antigénios no leite (Ball et al., 1991; NMC, 1998); e a determinação dos níveis de determinados componentes do leite (por exemplo, de gordura, de lactose e de caseína; Park et al., 2007; NMC, 1998). constituem-se como outras possíveis alternativas de diagnóstico. No entanto, muitas delas, em determinado contexto, podem não permitir chegar a uma conclusão clara, estão mais indicadas para determinadas situações do que para outras e/ou deverão, idealmente, ser utilizadas em associação com outras técnicas, de modo a revestirem-se com algum poder de diagnóstico. As proteínas de fase aguda (por exemplo, a proteína sérica amiloide A e a haptoglobina) têm sido testadas em vários ensaios experimentais (Suojala, Orro, Järvinen, Saatsi & Pyörälä, 2008) e de campo (Kováč, Popelková, Tkáčiková, Burdová & Ihnát, 2007) como possíveis métodos de diagnóstico; e os resultados de vários estudos têm demonstrado que podem vir a ter aplicabilidade numa perspetiva futura. No âmbito deste trabalho, apenas se procedeu a uma breve caracterização das técnicas de diagnóstico que foram utilizadas, as restantes encontram-se descritas extensivamente na literatura, pelo que não foram aqui relatadas.

Exame físico do quarto ou da glândula mamária clinicamente infetada

A avaliação macroscópica do leite, por eliminação dos primeiros jatos de leite, deve ser feita durante a preparação das vacas para ordenha. No entanto, a observação e a palpação de um quarto ou de uma glândula, com suspeita de mastite clínica, devem ser realizadas, idealmente com o úbere «vazio», isto é, imediatamente após a ordenha. As vacas com mastite clínica podem apresentar diversos sinais clínicos de doença, que já foram aqui referidos, consoante o agente etiológico envolvido e/ou a gravidade da infeção. (Rosenberg et al., 1979; NMC, 1998).

CCS

O leite, mesmo o dito «normal» (não mastítico), é constituído por diferentes tipos de células: macrófagos ($\pm 60\%$), linfócitos ($\pm 30\%$), neutrófilos ($\pm 10\%$) e células epiteliais mamárias ($\pm 2\%$). Estas podem ser contadas passando a ser expressas sob a designação de CCS (Schukken et al., 2001; Pyörälä, 2003).

A qualidade do leite cru pode ser avaliada tendo em conta a sua composição (teor de gordura, teor proteína, teor lactose, teor sólidos, etc.) e o grau de higiene (CBT e CCS). Muitas organizações nacionais e internacionais consideram a CCS como o principal parâmetro de aferição da qualidade do leite. A CCS reflete o estado de saúde da glândula mamária e mede o risco de ocorrência de alterações não fisiológicas na composição do leite (Dohoo & Meek, 1982; Harmon, 1994; van Schaik, Lotem & Schukken, 2002; Pyörälä, 2003; Barbano, Ma & Santos, 2006; Blowey & Edmondson, 2010).

De uma forma geral, têm sido propostos os limiares das 200 000 CS/ml de leite e das 100 000 CS/ml de leite para deteção de infeção ao nível da vaca (Dohoo, 2001; Ruegg & Reinemann, 2002) e do quarto (Sargeant, Leslie, Shirley, Pulkrabek & Lim, 2001; Djarbi, Bareille, Beaudeau, & Seegers, 2002), respectivamente. No entanto, estes valores podem variar em função de diversos fatores. A presença de IIM é a principal causa de variação no valor da CCS. O número de lactações ou a idade dos animais (Dohoo & Meek, 1982; Schepers, Lam, Schukken, Wilmink, & Hanekamp, 1997; Bradley & Green, 2005); a fase da lactação (Dohoo & Meek, 1982; Barkema, Schukken, Lam, van Goubergen & de Gee, 1997; Schepers et al., 1997; Bradley & Green, 2005); as estações do ano (Dohoo & Meek, 1982; Schepers et al., 1997; Bradley & Green, 2005); as variações entre vacas associadas a diferenças fisiológicas inatas (Bradley & Gren, 2005); o intervalo entre ordenhas; o momento da colheita de amostras de leite (Hamann, 2001; Hogeveen, Miltenburg, den Hollander & Frankena, 2001); a alimentação; determinadas doenças (Bradley & Green, 2005); o *stress*; o transporte e o

armazenamento das amostras de leite; e os erros de determinação, normalmente associados ao método e ao grau de calibração dos aparelhos utilizados para contarem CS (Dohoo & Meek, 1982; Bradley & Green, 2005), constiuem exemplos de outros fatores que podem influenciar o valor de CCS obtido.

As CS podem ser avaliadas com recurso, por exemplo, ao teste californiano de mastites (TCM) ou a contadores eletrónicos automáticos. O TCM é um *cow side test*, que permite detetar de forma indireta casos de mastite subclínica, por determinação semi-quantitativa da CCS. Este teste avalia o teor celular do leite cru, por meio da adição de um reagente — que consiste numa substância detergente e, por vezes, num indicador de pH (púrpura de bromocresol) — sobre um pequeno volume de leite contido numa placa de teste. O TCM caracteriza-se por ser um método simples, podendo ser realizado pelo ordenhador no decorrer da ordenha; barato; rápido e bastante eficiente na deteção de quartos ou de vacas com IIM (Sargeant et al., 2001; Dingwell, Leslie, Schukken, Sargeant & Timms, 2003; Radostitis et al., 2007; Lam et al., 2009; Blowey & Edmondson, 2010). Deste modo, pode constituir-se como uma ferramenta bastante útil para, após o tratamento, avaliar a recuperação de animais alvo de mastites clínicas; e também em situações em que se torna necessário identificar quais as vacas com CCS elevadas e qual/quais o(s) quarto(s) infetado(s) para, por exemplo, proceder-se à colheita de amostras de leite para microbiologia ou para identificar-se os animais ou os quartos que devem ser submetidos à antibioterapia de secagem (Poutrel & Rainard, 1981; Mason, 2005; Bradley & Green, 2005; O'Grady, 2007; Lam et al., 2009). No entanto, também apresenta algumas desvantagens, como, por exemplo, não permite obter um valor de CCS exato, apenas deteta quartos com CCS iguais ou superiores às 400 000 células/ml de leite, e há uma grande variabilidade nos resultados obtidos, muitas vezes relacionado com a perícia dos operadores (Blowey & Edmondson, 2010).

A medição da CCS com recurso a contadores eletrónicos automáticos, embora seja um procedimento mais dispendioso do que o TCM, é o único método que nos dá com exatidão o teor celular do leite cru de um determinado quarto, vaca ou tanque de leite. Existem vários métodos automáticos para contar CS, no entanto, o *Fossomatic cell counter*[®], que se baseia no princípio da citometria de fluxo, é considerado o método padrão, sendo o mais utilizado pelos laboratórios e pelos estabelecimentos de tratamento ou de transformação de leite cru para determinação do valor exato da contagem de células somáticas de vacas individuais (CCSVI) e da CCSLT, respetivamente (Pyörälä, 2003; Lam et al., 2009; Blowey & Edmondson, 2010). A CCS pode ser mensurável ao nível da vaca ou no tanque de leite. A CCSVI é a melhor forma de identificar vacas com mastites subclínicas. A sua determinação é feita através da colheita de uma amostra de leite composta (leite dos quatro quartos de uma vaca) e deve

proceder-se à sua determinação mensal ou, pelo menos, bimestral. Os produtores que utilizam esta prática por rotina tendem a estar mais atentos à saúde do úbere dos seus animais, o que lhes permitirá tomar medidas adequadas mais precocemente sempre que um possível, ou até mesmo, problema ocorra nas suas explorações (Dohoo & Meek, 1982; IDF, 1999; Pyörälä, 2003; Schukken, Wilson, Welcome, Garrison-Tikofsky & Gonzalez, 2003; Blowey & Edmondson, 2010).

A CCSLT reflete a CCSVI de todo o efetivo e, portanto, fornece uma estimativa geral da prevalência de IIM na exploração, sobretudo em termos de mastites subclínicas. De uma forma geral, uma CCSLT de 200 000 células/ml de leite indica que até 15 % das vacas do efetivo estarão infetadas em um ou mais quartos. Por cada aumento de 100 000 células/ml de leite de tanque pode afirmar-se que há um aumento de cerca de 8 % a 10 % na taxa de infeção (NMC, 2001; Bradley & Green, 2005; Bradley, Breen & Green, 2007a).

A CCSLT é o principal parâmetro utilizado pela indústria para determinação da qualidade do leite, e é um dos fatores que influencia o preço final do leite pago ao produtor. Os produtores podem receber os resultados das CCSLT de diferentes formas: resultados individuais, média mensal, média dos últimos três meses e média anual (Blowey & Edmondson, 2010). Na UE, o limite máximo de CS no leite cru, que pode entrar na cadeia alimentar, é de 400 000 células/ml de leite, o qual é determinado com base na média geométrica de um período de três meses com, pelo menos, uma análise mensal (Council Directive 92/46/EEC). Este limite máximo também encontra-se em vigor na Suíça, na Noruega, na Nova Zelândia e na Austrália, enquanto nos EUA e no Canadá os limites máximos são de 750 000 e de 500 000 células/ml de leite, respetivamente (Schukken, Leslie, Weersink & Martin, 1992; Smith & Hogan, 1998; Schukken et al., 2001; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, and Food and Drug Administration, 2009). No entanto, em muitos países, já existem programas de incentivo, para os produtores produzirem leite com CCS inferiores às 200 000, às 150 000 ou, até mesmo, às 100 000 células/ml de leite. Os que não conseguem cumprir estes objetivos, e apesar de se manterem abaixo do limite legal permitido, não recebem bonificações ou podem até mesmo serem alvo de penalizações. A aplicação destas medidas tem contribuído muito para a diminuição da CCS em muitos países (Schukken et al., 2001; Hillerton & Berry, 2004; More, 2009).

Para além das CS serem vistas como uma consequência de IIM, estas células ao longo dos últimos tempos têm também sido alvo de várias investigações e interpretações, sobre a possibilidade de serem um fator predisponente e/ou protetor para mastites clínicas. Determinados trabalhos já demonstraram que, vacas com elevadas e baixas descargas celulares estiveram em maior e em menor risco de contraírem mastite clínica, ou

apresentaram maior e menor número de casos de mastite clínica do que as com baixas e elevadas descargas celulares, respetivamente. Esta situação pode verificar-se porque vacas com elevadas CCS estão subclínicamente infetadas e, muitas vezes, estas infeções podem evoluir para mastite clínica (Coffey, Vinson & Pearson, 1986; Deluyker, Gay & Weaver, 1993; Beaudeau, Seegers, Fourichon & Hortet, 1998; Rupp & Boichard, 2000; de Haas, Barkema & Veerkamp, 2002; Breen et al., 2009; van den Borne et al., 2011).

Outros autores, porém, também defendem que o inverso pode ocorrer, isto é, efetivos leiteiros com baixas CCSLT ou vacas com baixas CCS podem ser alvos de uma maior incidência/risco de mastites clínicas e/ou de sinais clínicos de mastite mais graves (Miltenburg et al., 1996; Barkema et al., 1998a; Elbers et al. 1998; Tadich et al., 1998; Suriyasathaporn, Schukken, Nielen & Brand, 2000b; Beaudeau, Fourichon, Seegers, Bareille, 2002).

Esta situação depende do tipo de determinação de CCS (quarto, vaca ou leite de tanque) ou pode verificar-se em determinados contextos epidemiológicos. Em termos de CCS, por exemplo, as vacas podem ter uma elevada descarga celular num quarto, mas baixas descargas celulares nos outros quartos. E nestas condições poderão estar em elevado risco de desenvolverem mastite clínica neste quarto específico, no entanto, não são identificadas como tendo elevadas CCS devido ao efeito diluidor operado pelo leite dos outros quartos. Para além disto, pode dever-se também a uma baixa prevalência de IIM por agentes «menores» de mastite bovina. Determinados trabalhos (Pankey, Nickerson, Boddie & Hogan, 1985; Rainard & Poutrel, 1988; Schukken, Van de Geer, Grommers, Smit & Brand, 1989b; Matthews, Harmon & Smith, 1990; Matthews, Harmon & Langlois, 1991) consideram que a presença destes microrganismos, ditos «menores», na glândula mamária possam limitar o desenvolvimento de IIM por agentes «maiores». O efeito protetor conferido pelos agentes «menores» pode dever-se a aumentos moderados da CCS, à produção de bacteriocinas (Jetten & Vogels, 1972; Skalka, 1986) e/ou a fenómenos de competição/antagonismo entre os diferentes micro-organismos no interior da glândula mamária (Rainard & Poutrel, 1988). Todavia, esta condição pode nem sempre se verificar e, pelo contrário, quartos infetados por agentes «menores» podem até estar mais predispostos para IIM por agentes «maiores» comparativamente aos não infetados (Pankey et al., 1985; Lam et al., 1997; Berry & Hillerton, 2002a; Berry & Hillerton, 2002b).

Detilleux, Vangroenweghe e Burvenich (2006) demonstraram que são necessárias CCS acima das 2×10^6 células/ml de leite para combater eficazmente IIM por *Escherichia coli*. Assim sendo, o fator crítico neste processo não parece ser o número de CS presentes inicialmente na glândula mamária, mas sim a velocidade com que se desencadeia a resposta imunológica,

nomeadamente através mobilização de células de defesa para a glândula mamária (Heyneman, Burvenich & Vercauteren, 1990; Burvenich et al., 2007).

O papel que os agentes «menores» de mastite bovina e/ou as CS podem ter na prevenção de IIM por outros agentes, ainda não se encontram totalmente esclarecidos. Estes agentes «menores» devem, por isto, ser encarados como qualquer outro microrganismo de mastite bovina, e não como agentes protetores de IIM. Esta área carece ainda de futuras investigações (Taponen et al., 2007).

Culturas microbiológicas

A identificação dos agentes patogénicos responsáveis por mastites na exploração é extremamente útil, pois, permite não só no imediato, mas também no futuro, tomadas de decisões mais precoces e sensatas, com vista à instituição de um possível tratamento e/ou à implementação de medidas de controlo mais eficazes para a resolução de problemas relacionados com IIM. Para o laboratório podem ser submetidas amostras de leite de tanque, compostas e/ou de quartos individuais (Dinsmore, English, González, Sears & Schulte, 1991; NMC, 1998; Jayarao, Pillai, Sawant, Wolfgang & Hegde, 2004; Mason, 2005).

O leite de tanque não deve ser utilizado para pesquisa de agentes ambientais de mastite bovina, porque estes microrganismos podem provir não só de glândulas mamárias infetadas, mas também da superfície dos tetos e dos úberes; e de diversas fontes ambientais das vacarias: do material das camas, das fezes, da água de lavagem dos equipamentos de ordenha, etc. No entanto, pode ser bastante útil para pesquisa de agentes contagiosos, visto que estes provêm principalmente de glândulas mamárias infetadas. Todavia, muitas vezes obtêm-se resultados falsos negativos, que podem estar associados ao efeito diluidor do leite de tanque, à eliminação dos microrganismos dos quartos infetados em baixa quantidade ou de forma intermitente, e/ou à sensibilidade da técnica de cultura microbiológica utilizada para pesquisa. A colheita e a análise de múltiplas e consecutivas amostras de leite de tanque, durante um determinado período de tempo, devem ser praticadas para se aumentar a probabilidade de deteção de agentes patogénicos de mastite bovina e, assim, promover-se a uma classificação mais fidedigna dos efetivos leiteiros em termos de prevalência de IIM (Bramley, Mckinnon, Staker & Simpkin, 1984; Sears, Smith, English, Herer & Gonzalez, 1990; Godkin & Leslie, 1993; Brito, Brito, de Souza & Vargas, 1998; Hayes et al., 2001; Pinho, Thompson & Carvalheira, 2010).

O processamento laboratorial de amostras de leite compostas é um método mais barato do que o de amostras de quartos individuais, é capaz de providenciar bons resultados, e deve fazer

parte do plano de biossegurança de qualquer exploração que tenha por hábito renovar o efetivo através da compra de novos animais. Todavia, a utilização deste tipo de amostras para pesquisa de micro-organismos de mastite bovina apresenta algumas desvantagens comparativamente à de quartos individuais: maior risco de se obterem amostras contaminadas e menor sensibilidade da técnica de cultura microbiológica, devido ao efeito diluidor operado pelo leite dos quatro quartos (Dinsmore et al. 1991; NMC, 1998; Mason, 2005).

As amostras de leite de quartos individuais são as que fornecem informações mais relevantes, devendo, por isto, serem o tipo de amostras reportadas para o laboratório, sobretudo se estivermos perante casos de mastite clínica; e/ou de IIM pouco comuns, graves e/ou que não respondem ao tratamento (NMC, 1998; Mason, 2005; Lam et al., 2009).

No que diz respeito às explorações com elevadas CCSLT e, portanto, com uma elevada prevalência de mastites subclínicas, devem ser colhidas e submetidas para análise microbiológica amostras de leite de, pelo menos, 10 a 12 vacas representativas do problema, de acordo com as CCSVI e, se possível, com o auxílio do TCM. Quanto aos casos de mastite clínica, idealmente, devem ser colhidas e enviadas para o laboratório amostras de leite de todos os casos, antes da instituição de qualquer tratamento. Não havendo esta possibilidade, as amostras de leite que não forem enviadas devem ser convenientemente congeladas, para que, se for necessário, possam ser submetidas mais tarde. Quando se torna necessário investigar um surto de mastites clínicas, numa exploração leiteira, devem ser reportadas para o laboratório amostras de leite dos primeiros 10 casos (NMC, 1998; Mason, 2005; O'Grady, 2007; Lam et al., 2009).

1.3.3. Terapêutica

As explorações leiteiras devem ter implementados programas de controlo e de tratamento de mastites bovinas, de forma a minimizarem os prejuízos económicos, a disseminação das infeções dentro do efetivo, as resistências aos antibióticos e a assegurarem o bem-estar animal (Fitzpatrick et al., 1998; Hillerton & Berry, 2005; Raymond, Wohrle & Call, 2006; Kalmus, Aasmäe, Kärssin, Orro & Kask, 2011).

Os protocolos terapêuticos devem ser estabelecidos pelo médico veterinário assistente com base nos seguintes critérios: a eficácia comprovada, o aspeto económico e o intervalo de segurança/resíduos. A terapêutica normalmente assenta no uso de antimicrobianos e/ou em tratamento de suporte (anti-inflamatórios esteroides ou não esteroides, oxitocina, fluidoterapia e aumento da frequência de ordenha dos quartos infetados). Em bovinos leiteiros, a principal utilização dos antibióticos tem sido no tratamento de mastites. Estes já são usados no

tratamento deste tipo de afeções há mais de 50 anos, contudo, existem ainda divergências quanto à forma de tratamento mais eficiente, segura e económica (Erskine, 1995; Meek et al., 1986; Raymond et al., 2006; George et al., 2008; Thomson, Rantala, Hautala, Pyörälä, & Kaartinen, 2008; Pyörälä, 2009).

Para a eficácia da antibioterapia devem ser tidos em conta os seguintes aspetos (Hillerton & Klien, 2002; Pyörälä, 2009):

- a) as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas;
- b) o espectro de ação. De uma forma geral, são sempre preferíveis os antibióticos de estreito espectro aos de largo espectro;
- c) a duração da terapêutica. Muitas vezes, uma das causas de falhas terapêuticas são os tratamentos demasiado curtos. Os casos de mastite clínica devem ser tratados, pelo menos, durante três dias;
- d) a monitorização da terapêutica. A avaliação da resposta ao tratamento pode ser feita, se disponível, com recurso à CCS, ao TCM e/ou às culturas microbiológicas, sobretudo se estivermos perante casos de mastite por agentes contagiosos.

As vacas com mastites podem ser tratadas durante a lactação e no período seco. De uma forma geral, o tratamento de IIM durante a lactação está apenas indicado para os casos clínicos. Relativamente às mastites subclínicas, e tendo em conta os resultados de vários estudos, não existe unanimidade na literatura em termos de benefícios económicos; de melhoria das taxas de sobrevivência e/ou de refugo dos animais dentro efetivo; e de aumento das taxas de cura microbiológicas e da produção de leite, quando se procede ao tratamento desta condição durante a lactação comparativamente à opção não tratamento. As condições económicas locais; a existência de medidas preventivas ou de um programa de controlo de mastites na exploração; a raça, o valor genético do animal; os quartos infetados, a idade/o número de lactação, e a fase de lactação das vacas; o tempo decorrido entre a infeção e o diagnóstico; o(s) agente(s) patogénico(s) envolvido(s), o valor da CCS antes da instituição do tratamento; e o protocolo terapêutico (o antibiótico, a via de administração e a duração do tratamento) são tudo fatores que devem ser considerados antes da instituição de qualquer tratamento a vacas com mastite subclínica durante a lactação (McDermott, Erb, Natzke, Barnes & Bray, 1983; Sol, Sampimon, Snoep & Schukken, 1997; Wilson, González, Case, Garrison & Gröhn, 1999; Deluyker, Oye & Boucher, 2005; Sandgren, Waller & Emanuelson, 2007; van den Borne, Halasa, Schaik, Hogeveen & Nielen, 2010a; van den Borne, van Schaik, Lam & Nielen, 2010b).

A terapêutica das vacas no período seco constitui um dos cinco pontos do plano de controlo de mastites. Os dois objetivos da terapêutica de secagem são: primeiro, curar infeções da glândula mamária, provenientes da lactação, que estejam presentes no início da secagem; segundo, atuar profilaticamente, prevenindo a ocorrência de novas IIM durante o período seco. Atualmente, existem três modalidades terapêuticas de secagem, isto é, as vacas podem ser tratadas por via intramamária só com antibiótico, com antibiótico e um selante de tetos ou somente com um selante de tetos. O selante de tetos é um produto à base de subnitrato de bismuto e sem qualquer propriedade antimicrobiana. No entanto, e ao contrário do tampão de queratina, é capaz de assegurar um encerramento eficaz do canal do teto durante todo o período seco, impedindo assim a entrada de novos microrganismos na glândula mamária. (Woolford, Williamson, Day & Copeman, 1998; The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1999; Huxley, Green, Green & Bradley, 2002; Godden et al., 2003; Hillerton & Berry, 2005).

Nos anexos 2 e 3 encontram-se breves descrições das entidades clínicas acompanhadas e das atividades desenvolvidas, respetivamente, durante o estágio.

1.4. Objetivos

A presente dissertação procurou estudar a relação entre a CCS e a incidência de mastites clínicas, numa exploração de bovinos leiteiros em Portugal. Será que as vacas com elevadas CCS ($> 200\,000$ células/ml de leite) estão em maior risco de desenvolverem mastite clínica do que as com baixas descargas celulares ($< 200\,000$ células/ml de leite)? O efetivo leiteiro foi ainda caracterizado para um conjunto de fatores que podem influenciar a dinâmica de IIM: animal, ambiente, manejo, procedimentos de ordenha e micro-organismos de mastite bovina.

CAPÍTULO 2 — Materiais e métodos

2.1. Caracterização da exploração

O presente trabalho foi realizado numa exploração leiteira do Ribatejo, constituída, aproximadamente, por 900 animais da raça *Holstein Friesian*, dos quais cerca de 400 eram vacas em lactação com uma produção média de leite de 10 800 kg em 305 dias, um teor bacteriano inferior às 50 000 bactérias/ml de leite, um intervalo médio entre partos de 430 dias e um período médio de secagem de 50 dias. A renovação do efetivo era feita através de animais nascidos na própria exploração. Entre 1989 e 2007, foi uma exploração fechada,

estatuto que foi quebrado em 2008 pela entrada de dois touros para cobertura. Entre janeiro de 2007 e março de 2009 verificou-se um aumento do número de animais no efetivo em lactação (vacas em lactação e secas), com um predomínio de animais jovens, isto é, mais de 50 % foram vacas de 1.^a e de 2.^a lactação (tabela 2.1.). Em termos profiláticos, era feita a prevenção e o controlo das seguintes doenças:

- a) vacas e novilhas:
 - i. rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR/BHV-1), parainfluenza tipo 3 (PI3), vírus da doença respiratória sincicial bovina (BRSV), diarreia viral bovina (BVD) e leptospirose (*Triangle 9*[®], Fort Dodge);
 - ii. clostridioses (*Covexin 10*[®], MSD Animal Health LDA).
- b) vitelos:
 - i. diarreias neonatais provocadas por *Escherichia coli*, rotavírus e coronavírus através da ingestão de colostro de vacas vacinadas (*Trivacton 6*[®], Merial Animal Health; e *Rotavec Corona*[®], MSD Animal Health LDA);
 - ii. IBR, PI3, BRSV e BVD (*Rispoval 4*[®], Pfizer Animal Health).

A avaliação da exploração em termos de práticas de manejo (alojamentos/sistemas de estabulação, camas, alimentação, e rotina e procedimentos de ordenha) foi realizada por observação direta no decorrer do estágio e por elaboração de um questionário ao produtor e aos seus colaboradores. Por sua vez, a caracterização em termos de CCS e para os vários parâmetros relacionados com mastites clínicas, enunciados mais abaixo neste capítulo, foi efetuada com base na análise de registos relativos ao período entre janeiro de 2007 e março de 2009. A cultura microbiológica de amostras de leite de casos de mastite subclínica e de mastite clínica foi efetuada entre janeiro e março de 2009.

Tabela 2.1. Número de vacas (em lactação e secas) existentes na exploração no mês de Janeiro de 2007, de 2008 e de 2009.

Lactação	Ano 2007		Ano 2008		Ano 2009	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
1. ^a	131	39,7	163	35,5	194	36,9
2. ^a	56	17,0	113	24,6	137	26,0
3. ^a	44	13,3	49	10,7	69	13,1
4. ^a	36	10,9	49	10,7	41	7,8
5. ^a	34	10,3	33	7,2	35	6,7
≥ 6. ^a	29	8,8	52	11,3	50	9,5
Total	330	100,0	459	100,0	526	100,0

n — Número de vacas;

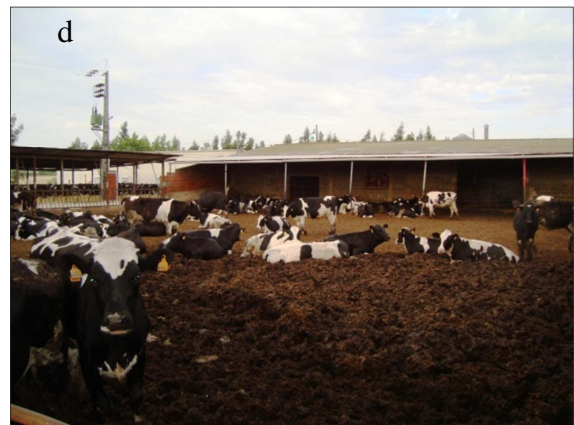
% — percentagem de vacas.

2.1.1. Práticas de manejo

Os animais estavam divididos por parques em sistema de estabulação livre com cubículos, em função do peso, da produção e/ou da idade (figura 2.1.). As camas eram à base de palha e mudadas de acordo com o seu grau de conspurcação.

Os vitelos até ao desmame eram alimentados à base de leite de substituição ou de refugo (mastítico e/ou com antibiótico) e de concentrado. Após o desmame e até aos seis meses de idade, a alimentação era à base de feno e de concentrado *ad libitum*. A partir dos seis meses de idade, todos os animais passavam a ser alimentados por meio do sistema *Total Mixed Ration* (TMR), de acordo com as suas necessidades específicas, que eram calculadas por um nutricionista tendo em conta o sistema National Research Council (NRC). Para a formulação desta ração composta completa eram utilizadas forragens (silagem de milho, feno-silagem de azevém, feno, etc.), subprodutos de origem vegetal, que variavam em função da época do ano (drêche de cerveja, repiso de tomate, etc.), e concentrado.

Figura 2.1. Estabulação livre (original): a) e b) vitelos lactentes; c) vitelas pós-desmame; d) novilhas.



As vacas em lactação estavam alojadas em parques do tipo *free stall barn*, em função da produção e da CCS (figura 2.2.). Os parques estavam munidos por ventoinhas e dispersores de água, que eram acionados automaticamente quando a temperatura ambiente atingia os 25 °C e os 29 °C, respetivamente. De uma forma geral, não se observou sobrelotação dos parques, existindo normalmente uma cama por vaca. As camas eram constituídas por duas camadas. A camada mais profunda era composta por uma mistura de estrume seco, palha e um composto à base de fosfato; sendo renovada duas vezes por ano. A camada superficial era constituída por palha e renovada uma vez por semana através de remoção das zonas sujas e de adição de novo material sobre o que já lá existia. Para além disto, de 15 em 15 dias, era ainda adicionada cal hidratada sobre as zonas mais húmidas das camas.

Figura 2.2. Vacas em lactação estabuladas em sistema de *free stall barn* (original).



O parque pré-parto/maternidade era do tipo *straw yard* com uma pequena zona exterior onde os animais tinham água e alimento à disposição. As vacas prenhas transitavam para este alojamento quando faltavam cerca de três semanas para a data prevista do parto e voltavam para os parques de produção nas primeiras 24 horas pós-parto (figura 2.3.).

Figura 2.3. Parque pré-parto/maternidade (original): a) zona interior; b) zona exterior no verão, após madrugada chuvosa.



A ordenha era feita em duas salas. A sala A com 24 pontos de ordenha destinava-se à ordenha de todas as vacas, à exceção das que apresentavam mastite clínica e das recém-paridas (até aos quatro ou cinco dias pós-parto), que eram ordenhadas na sala B composta por oito pontos de ordenha (figura 2.4.). De uma forma geral, as vacas eram conduzidas calmamente pelo ordenhador até à respetiva sala, e não exibiam sinais de *stress* e/ou de desconforto no parque de espera e durante a ordenha. A maioria delas apresentaram-se à ordenha com os úberes limpos e os flancos traseiros razoavelmente limpos, no entanto, algumas recém-paridas exibiram um grau de sujidade acima do desejado (figura 2.5.).

Figura 2.4. Salas de ordenha (original): a) sala A; b) sala B.



Figura 2.5. Grau de higiene dos animais à ordenha (original): a) vaca em lactação não recém-parida; b) vaca em lactação recém-parida.



Sistema de classificação de Hughes (2000; de 1 [muito limpo] a 5 [muito sujo]):

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| a.1) flanco: 1 | b.1) flanco: 3 |
| a.2) membros posteriores: 2 | b.2) membros posteriores: 5 |
| a.3) úbere: 1 | b.3) úbere: 1 |
| a.4) cauda: 1 | b.4) cauda: — |

De janeiro de 2007 a janeiro de 2009, na sala de ordenha A, todas as vacas foram submetidas a três ordenhas por dia, à exceção das recém-paridas que foram alvo de seis ordenhas diárias. A ordem de entrada para ordenha dos vários grupos de vacas foi a seguinte:

- vacas multíparas de alta produção;
- vacas recém-paridas (até 20 a 30 dias pós-parto) — 1.^a entrada;
- vacas primíparas de alta produção;
- vacas primíparas de baixa produção;
- vacas multíparas de média produção;
- vacas multíparas de baixa produção;
- vacas recém-paridas (até 20 a 30 dias pós-parto) — 2.^a entrada;
- vacas com CCS elevadas.

A ordenha foi realizada apenas por um ordenhador mediante a utilização de luvas, no entanto, estas não foram desinfetadas regularmente. Antes da ordenha, no parque de espera, era ainda efetuada as lavagens dos tetos e/ou dos úberes, por meio de jatos de água de dispersão automática (figura 2.6.) e, posteriormente, não era feita qualquer preparação dos tetos, isto é, a remoção dos primeiros jatos de leite, o *pre-dipping* e a secagem dos tetos. As unidades de ordenha, em certas ocasiões, foram removidas automaticamente e, noutras, manualmente.

Quando a remoção foi efetuada de forma manual, constatou-se que em determinados períodos foi feita tardiamente e, conseqüentemente, ocorreu sobreordenação.

Figura 2.6. Lavagem dos tetos e/ou dos úberes, no parque de espera da sala de ordenha, por meio de jatos de água de dispersão automática (original).

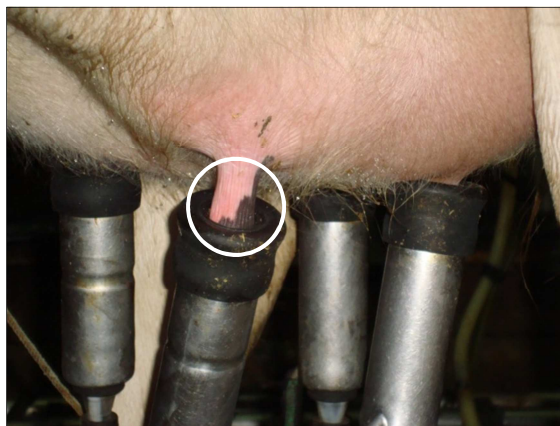


A partir de fevereiro de 2009, e como perspectiva futura, foram efetuadas as seguintes alterações na rotina e nos procedimentos de ordenha da sala A: redução do número de ordenhas diárias das vacas recém-paridas (passou-se das seis para as três ordenhas por dia); aumento do número de ordenhadores por ordenha (passou-se de um para dois ordenhadores); desinfecção regular das luvas durante a ordenha; ausência de lavagem automática dos tetos e/ou dos úberes no parque de espera; preparação dos tetos antes da ordenha (eliminação dos primeiros jatos de leite, *pre-dipping* [Prefoam[®]; Hypred] e limpeza dos tetos com um papel individual por quarto); e modo de remoção automático das unidades de ordenha sempre acionado.

Na sala de ordenha B, todas as vacas eram ordenhadas duas vezes por dia. Em primeiro lugar, eram ordenhadas as recém-paridas e, posteriormente, as com mastite clínica. A ordenha era efetuada apenas por um ordenhador, que não tinha por hábito utilizar luvas. Não havia lavagem dos tetos e/ou dos úberes no parque de espera, e os tetos eram preparados para ordenha do modo como já foi aqui referido. As unidades de ordenha eram removidas sempre manualmente, visto que esta sala não dispunha da funcionalidade automática para remoção das mesmas. Por isto, em algumas situações, observou-se a ocorrência de sobreordenação.

Por observação da ordenha, verificou-se a ocorrência de *liner slip* em cerca de 25 % das vacas e, na maior parte das vezes, não houve correção das tetinas ou esta foi feita tardiamente (figura 2.7.). A desinfecção das tetinas entre vacas durante a ordenha apenas era feita na sala B por imersão numa solução de hipoclorito de sódio.

Figura 2.7. *Liner slip* (círculo; original).



Da avaliação da condição física dos tetos após a ordenha constatou-se:

- a) cerca de 10 % dos tetos com um anel visível na base (figura 2.8.);
- b) cerca de 25 % dos tetos com congestão;
- c) Hiperqueratose da extremidade distal do teto (HEDT): cerca de 50 % dos tetos com um anel liso ou de superfície ligeiramente rugosa, 10 % com um anel rugoso e 5 % com um anel muito rugoso (figura 2.9.);
- d) não foram observadas alterações do estado da pele, da forma do teto e da abertura do canal do teto.

Figura 2.8. Teto com anel visível na base (original).

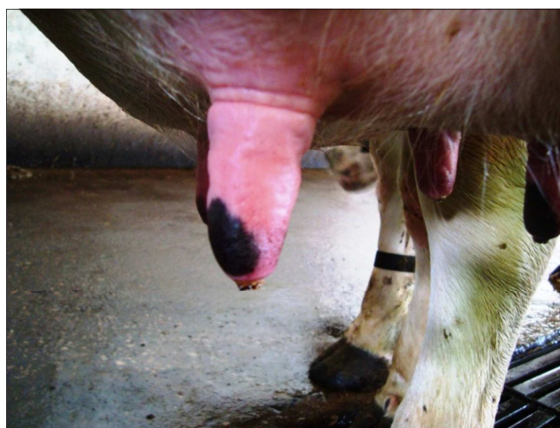


Figura 2.9. HEDT (original): a) teto sem anel de hiperqueratose (teto normal); b) teto com um anel liso ou de superfície ligeiramente rugosa; c) teto com anel rugoso; d) teto com congestão e anel muito rugoso.



Toda a superfície dos tetos, de todas as vacas, após a ordenha, era desinfetada com um *post-dip* à base de ácido láctico (*Filmadine*®, Hypred; figura 2.10.). No final de cada ordenha, as salas eram sempre lavadas. Os equipamentos por onde circulavam o leite eram lavados várias vezes, por meio de um sistema automático, com um detergente ácido e alcalino, de forma alternada.

Figura 2.10. *Post-dipping* com *Filmadine*[®] (original).



A terapêutica de secagem era efetuada em todos os quartos, de todas as vacas, após a última ordenha antes da secagem, da seguinte forma:

- a) limpeza e desinfeção da extremidade distal do teto com toalhetes desinfetantes;
- b) administração do conteúdo de um injetor intramamário por quarto (cefalónio [*Cepravin*[®] DC, MSD Animal Health, LDA] ou cefquinoma [*Cobactan*[®] DC, Intervet Schering-Plough Animal Health]), seguido de uma ligeira massagem no sentido ascendente;
- c) administração de um selante de tetos à base de subnitrato de bismuto (*Orbeseal*[®], Zoetis);
- d) *post-dipping* com um produto à base de ácido láctico (*Filmadine*[®], Hypred).

2.1.2. Contagem de células somáticas

Caracterização estatística de CCS

Os registos de contraste leiteiro, presentes no programa *Dairy Plan*[®] (Westfalia), foram analisados estatisticamente, em termos de CCS, pelo programa *Microsoft*[®] *Office Excel*[®] 2003.

As CCSLT mensais foram determinadas com base na média aritmética de CCSVI mensais (Bradley & Green, 2005), ou seja, não foram determinadas de acordo com os pressupostos legais exigidos pela autoridade europeia competente aos estabelecimentos de tratamento ou de transformação de leite cru de vaca, e que já foram aqui enunciados.

Utilização de CCS como forma de aferição do estatuto de IIM de cada vaca

O estatuto de infeção de cada vaca foi determinado com base nos valores de CCS mensais individuais. Considerou-se o valor das 200 000 CS/ml de leite, proveniente de amostras de leite compostas, como limiar para deteção de infeção ao nível da vaca (Dohoo, 2001; Bradley

& Green, 2005). As vacas em lactação, com base neste limiar, foram caracterizadas para os seguintes parâmetros (Biggs, 2005; Bradley et al., 2007a; Olde Riekerink, Barkema & Stryhn, 2007):

- a) vacas com infecção: proporção total de vacas com CCS superiores às 200 000 células/ml de leite num determinado mês;
- b) vacas sem infecção: proporção total de vacas com CCS iguais e/ou inferiores às 200 000 células/ml de leite num determinado mês;
- c) vacas com infecção crónica: proporção de vacas que num determinado mês apresentaram CCS acima das 200 000 células/ml de leite e que no mês anterior já houveram estado acima deste valor;
- d) vacas com infecção recente: proporção de vacas que num determinado mês apresentaram CCS acima das 200 000 células/ml de leite, mas que no mês anterior apresentaram CCS iguais ou inferiores a este valor;
- e) vacas sem infecção estável: proporção de vacas que num determinado mês apresentaram CCS iguais ou inferiores às 200 000 células/ml de leite e que no mês anterior já tinham estado no mesmo patamar;
- f) vacas com auto-cura de infecções recentes: proporção de vacas que num determinado mês apresentaram CCS iguais ou inferiores às 200 000 células/ml de leite, mas que no mês anterior estiveram acima deste valor.

As vacas podem também alterar o seu estado de infecção durante o período seco e, assim sendo, promoveu-se à sua caracterização para as quatro categorias seguintes (Biggs, 2005; Bradley & Green, 2005; Bradley et al., 2007a):

- a) «alta/alta»: proporção de vacas que no último contraste leiteiro antes da secagem apresentaram CCS acima das 200 000 células/ml de leite e que no primeiro contraste leiteiro da lactação seguinte se mantiveram acima deste valor.
- b) «alta/baixa»: proporção de vacas que no último contraste leiteiro antes da secagem apresentaram CCS acima das 200 000 células/ml de leite, mas que no primeiro contraste leiteiro da lactação seguinte apresentaram CCS iguais ou inferiores a este valor;
- c) «baixa/alta»: proporção de vacas que no último contraste leiteiro antes da secagem apresentaram CCS iguais ou inferiores às 200 000 células/ml de leite, mas que no primeiro contraste leiteiro da lactação seguinte estiveram acima deste valor;

- d) «baixa/baixa»: proporção de vacas que no último contraste leiteiro antes da secagem apresentaram CCS iguais ou inferiores às 200 000 células/ml de leite e que no primeiro contraste leiteiro da lactação seguinte se mantiveram neste patamar.

2.1.3. Mastites clínicas

Definição dos termos utilizados para análise (Blowey & Edmondson, 2000):

- a) caso de mastite clínica por quarto infetado: cada quarto infetado foi contabilizado como um caso de mastite clínica. Novos casos de mastite clínica, em quartos reincidentes, foram registados se o intervalo de tempo entre a cura clínica do último episódio e do novo episódio tivesse sido igual ou superior a sete dias;
- b) caso de mastite clínica por vaca infetada: cada vaca infetada foi considerada como um caso de mastite clínica, independentemente do número de quartos infetados. Novos casos de mastite clínica, em vacas reincidentes, foram contabilizados se o intervalo de tempo entre a cura clínica do último episódio e do novo episódio tivesse sido igual ou superior a sete dias;
- c) taxa de mastites: número de casos de mastite clínica (quartos infetados) por 100 vacas por ano. Fórmula:

$$\text{Taxa de mastites} = \frac{\text{n.º de casos de mastite clínica (quartos infetados) por ano} \times 100}{\text{n.º total de vacas na exploração (em lactação e secas)}}$$

- d) percentagem do efetivo afetado: percentagem de vacas da exploração que apresentaram, pelo menos, um caso de mastite clínica durante um ano. Fórmula:

$$\text{Percentagem de vacas com mastite clínica} = \frac{\text{n.º de vacas que tiveram mastite clínica durante um ano} \times 100}{\text{n.º total de vacas na exploração (em lactação e secas)}}$$

- e) taxa de recorrência: percentagem de quartos que necessitaram de, pelo menos, mais uma repetição de tratamento. Fórmula:

$$\text{Taxa de recorrência} = \frac{\text{n.º de casos de mastite clínica (quartos infetados) que necessitaram de repetição de tratamento} \times 100}{\text{n.º total de casos de mastite clínica}}$$

- f) incidência mensal: proporção de vacas que tiveram, pelo menos, um caso de mastite clínica por mês⁵. Fórmula:

$$\text{Incidência mensal} = \frac{\text{n.º de casos de mastite clínica (vacas infetadas) no mês } A}{\text{n.º total de vacas em risco de contrair mastite clínica no mês } A} \times 100$$

- g) incidência por lactação: proporção de vacas que foram alvo de, pelo menos, um caso de mastite clínica por lactação⁶. Fórmula:

$$\text{Incidência por lactação} = \frac{\text{n.º de casos de mastite clínica (vacas infetadas) na lactação } A}{\text{n.º total de vacas em risco de contrair mastite clínica durante a lactação } A} \times 100$$

- h) incidência por período de lactação (dias de lactação): proporção de vacas que sofreram, pelo menos, um episódio de mastite clínica por cada 60 dias de lactação⁷. Fórmula:

$$\text{Incidência por período de lactação} = \frac{\text{n.º de casos de mastite clínica (vacas infetadas) no período } A \text{ de lactação}}{\text{n.º total de vacas em risco de contrair mastite clínica durante o período } A \text{ de lactação}} \times 100$$

2.2. Recolha de amostras de leite

As amostras de leite de vacas com mastite subclínica foram recolhidas, em colaboração com um médico veterinário, em dois períodos com um intervalo de 35 dias e sem repetição de recolhas aos mesmos animais. Os critérios tidos em conta para determinação do número de amostras de leite a recolher foram: que não fosse muito dispendioso em termos económicos o seu processamento laboratorial, que não perturbasse em demasia a rotina da ordenha e que, ao mesmo tempo, refletisse o problema da exploração. Numa primeira fase, realizou-se uma pré-seleção de vacas que pudessem ser representativas do problema da exploração, tendo em conta os dois últimos registos de CCSVI, em relação à data da recolha, e os seguintes critérios:

- número de lactação (animais de várias lactações);
- período de lactação (animais em várias fases da lactação);
- duração da infeção (crónica e recente).

^{5,6,7} Um caso de mastite clínica foi contabilizado como uma vaca infetada, independentemente do número de quartos infetados.

Nesta exploração, salvo algumas exceções, todos os animais eram submetidos ao contraste leiteiro mensalmente (figura 2.11.).

Figura 2.11. Exemplo de resultados de contraste leiteiro (original).

CONTRASTE LEITEIRO			
Empresa/entidade responsável: _____			
Contrastador: _____			
Exploração/proprietário: _____			
Data de contraste: <u>27/01/2009</u>			
Data de emissão: <u>29/01/2009</u>			
ID	T. B. (%)	T. P. (%)	CCS (x 1000/ml de leite)
1035	3,60	2,99	123
1056	3,95	3,18	295
1081	6,08	2,63	666
1147	6,86	2,61	909
1149	3,70	3,23	81
2042	3,97	2,83	103
2169	4,93	2,90	443
2212	3,31	2,95	394
2344	2,32	2,75	983
2346	4,55	2,99	731
2390	2,86	2,76	35
2395	2,45	2,84	851
2448	4,89	2,78	637
2469	3,91	2,73	166
3247	3,39	2,68	85
3249	2,62	2,94	636
3301	3,12	2,99	243
(...)	(...)	(...)	(...)

ID — Número de identificação do animal;

T.B. — teor butíroso;

T.P. — teor proteico.

Numa segunda fase, antes de se proceder à recolha de amostras de leite, efetuou-se o TCM (*Laboratório Sorológico*[®]; figura 2.14.), a todas as vacas pré-selecionadas, da forma mais conveniente, até perfazer a amostragem pretendida. Posteriormente, às vacas que testaram positivo a este teste, recolheu-se uma amostra de leite do respetivo quarto. No caso de animais com múltiplos quartos com TCM positivo, o quarto selecionado foi sempre aquele que evidenciou reação mais positiva (O’Grady, 2007).

As mastites clínicas que surgiram durante o período de estudo, consoante a gravidade dos sinais clínicos apresentados pelos animais, foram classificadas em dois graus (graus II e III;

anexo 4). A recolha foi realizada, à semelhança do que já houvera sido efetuado em outros trabalhos, por colaboradores da exploração devidamente formados e sensibilizados para o efeito. O critério de colheita foi, sempre que possível, recolherem amostras de leite individuais a todos os quartos que surgissem com mastite clínica, antes da instituição de qualquer tratamento (Elbers et al., 1998; Bradley & Green, 2001; Mason, 2005; Bradley, Breen, Payne, Williams & Green, 2010).

A técnica de recolha de amostras de leite compreendeu os seguintes passos (NMC, 1999):

- a) identificação dos recipientes de colheita: número do animal, quarto, mastite subclínica ou clínica, e data da colheita (figura 2.12.);

Figura 2.12. Identificação dos copos de colheita (original).



- b) limpeza do teto: nas situações em que os tetos apresentaram-se muito conspurcados, podendo comprometer a assepsia da colheita, procedeu-se à sua limpeza com um papel individual, seco e descartável; ou com água. Os que foram lavados, posteriormente foram secos com um papel individual e descartável;
- c) eliminação dos primeiros jatos de leite (figura 2.13.);

Figura 2.13. Eliminação dos primeiros jatos de leite (original).



d) TCM⁸ (figura 2.14.);

Figura 2.14. TCM (original).



e) *pre-dipping* dos tetos: com um produto à base de ácido láctico (*Prefoam*[®], Hypred), deixando-se a solução atuar durante cerca de 30 segundos (figura 2.15.);

⁸ procedimento efectuado apenas às vacas com mastite subclínica.

Figura 2.15. *Pre-dipping* com *Prefoam*[®] (original).



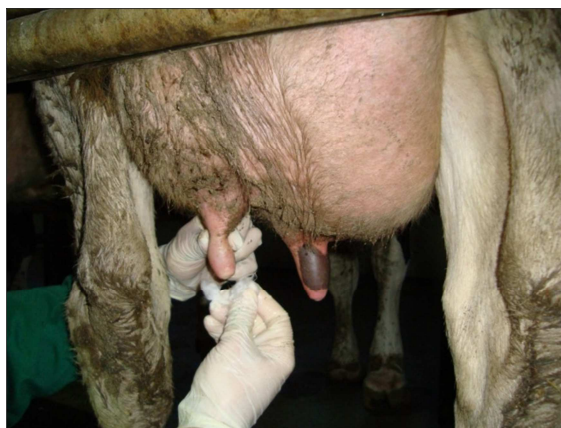
- f) secagem do teto com um papel ou com um pano individual (figura 2.16.);

Figura 2.16. Secagem do teto com um pano (original).



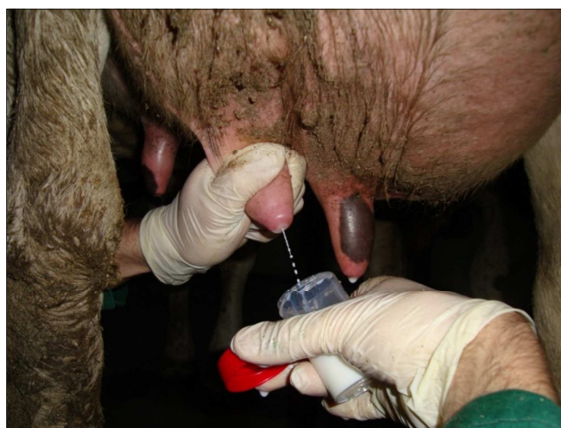
- g) desinfecção do teto, sobretudo do orifício: utilizou-se um pedaço de algodão embebido em álcool a 70 %. Se após a desinfecção o algodão ainda evidenciasse a presença de sujidade repetia-se a operação com um novo pedaço de algodão e, assim, sucessivamente (figura 2.17.);

Figura 2.17. Desinfecção do teto com um pedaço de algodão embebido em álcool a 70 % (original).



- h) recolha de amostras de leite para frascos de colheita esterilizados de 60 ml (*Bastos Viegas, S.A.*[®]): após a abertura do frasco, a tampa permaneceu na vertical e com face interna voltada para baixo, de forma a minimizar qualquer tipo de conspurcação e, conseqüentemente, contaminar a amostra no momento do seu encerramento. A recolha, de apenas alguns jatos de leite (três a cinco mililitros), foi feita com o frasco inclinado cerca de 45° ou o mais possível na horizontal, guardando-se uma determinada distância ao teto, para evitar contaminação da amostra final (figura 2.18.);

Figura 2.18. Recolha de amostra de leite para frasco de colheita esterilizado (original).



- i) acondicionamento das amostras de leite: imediatamente após a colheita e durante o transporte para o laboratório, as amostras foram acondicionadas no frigorífico e/ou numa mala térmica, de modo a que a sua temperatura baixasse rapidamente para os quatro graus Celsius (figura 2.19.).

Figura 2.19. Acondicionamento de amostras de leite numa mala térmica (original).



2.3. Processamento laboratorial de amostras de leite.

As amostras foram processadas no prazo de 24 a 48 horas após a colheita, tendo sido submetidas às análises microbiológicas de rotina para pesquisa de agentes microbianos aeróbios, exceção feita à pesquisa de *Mycoplasma* spp. (Quinn, Carter, Markey & Carter, 1994; NMC, 1999; figura 2.30.):

- a) sementeira: as amostras foram agitadas; e inocularam-se 10 µl de leite de cada em agar MacConkey (*Merck*®) e em agar Columbia suplementado com 5 % de sangue desfibrinado de ovino (*BioMérieux*®), por meio de ansas calibradas descartáveis de 10 µl (*SarsTedT*®; figura 2.20);

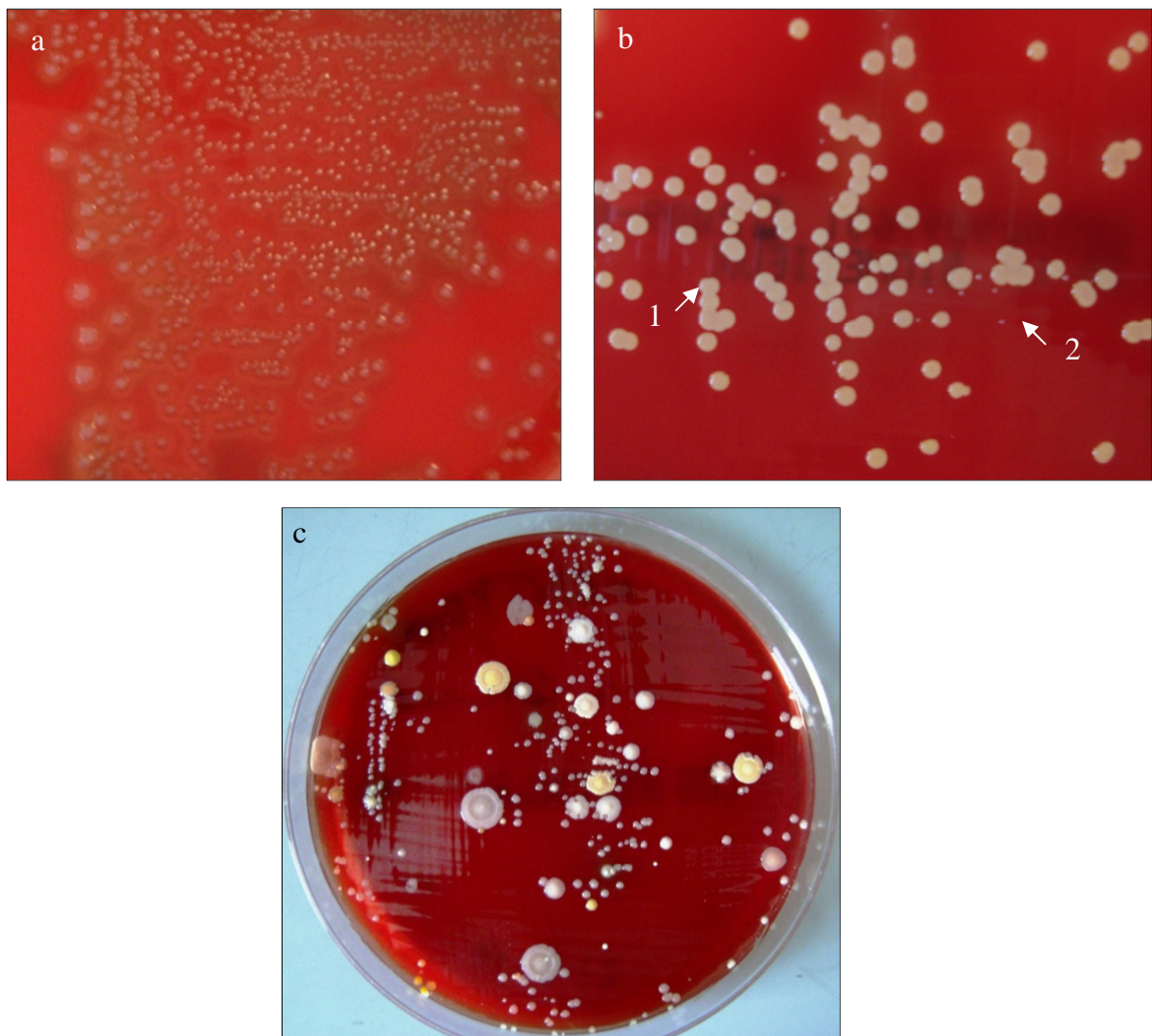
Figura 2.20. Inoculação de amostra de leite em agar Columbia (original).



- b) incubação das placas: invertidas, em estufa a 37 °C, em condições de aerobiose e durante 24 a 48 horas;
- c) observação das placas: as placas com um (culturas puras) ou dois (culturas mistas) tipos morfológicos, e desde que um ou ambos os tipos se encontrassem em número

igual ou superior às 500 unidades formadoras de colónias (ufc) por mililitro de leite, foram classificadas como amostras positivas. Posteriormente, foram caracterizadas macroscopicamente quanto à morfologia das colónias (cor; tamanho; brilho; regularidade do contorno; e presença ou ausência de α e de β -hemólise). As placas com um número igual ou superior a três tipos morfológicos, independentemente do número de ufc, foram registadas como amostras contaminadas (figura 2.21.). As placas sem crescimento, ou com a presença de um ou dois tipos morfológicos por placa, e em que ambos estivessem em número inferior às 500 ufc/ml de leite, foram consideradas como amostras sem crescimento;

Figura 2.21. Agar Columbia (original): a) cultura pura com α -hemólise; b) cultura mista; c) cultura contaminada.



- d) isolamento: os micro-organismos de amostras positivas foram isolados por repicagem de colônias únicas para agar Columbia suplementado com 5 % de sangue desfibrinado de ovino (*BioMérieux*[®]) para obtenção de culturas puras;
- e) incubação das placas: invertidas, em estufa a 37 °C, em atmosfera de aerobiose, durante 24 horas;
- f) identificação: os micro-organismos isolados foram identificados, se, após incubação, se observou a presença de apenas um tipo de colônias (figura 2.22.):

Figura 2.22. Colônias bacterianas isoladas em agar Columbia (original).



- i. coloração de Gram;
- ii. observação ao microscópio ótico: avaliou-se a coloração, a forma e a organização dos micro-organismos isolados (figura 2.23.). Nas situações em que surgiram dúvidas quanto à classificação das bactérias em de Gram positivo ou de Gram negativo realizou-se o teste do hidróxido de potássio a 3 %;

Figura 2.23. Cocos de Gram positivo (coloração Gram, x 1000; original).



- iii. os cocos de Gram positivo foram submetidos ao teste da catalase (figura 2.24.). Os catalase positivos foram testados para a produção de coagulase (*Merck*[®]; figura 2.25.) e os catalase negativos foram sujeitos à prova de hidrólise da esculina (figura 2.26.). Os cocos de Gram, catalase e coagulase positivos foram identificados como *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP); e os coagulase negativos foram identificados como SCN. Os cocos de Gram positivo, catalase negativos e esculina positivos foram identificados como *Streptococcus uberis*; e os esculina negativos foram submetidos à prova de CAMP (figura 2.27.). Nas situações em que, apesar da reação à esculina ter sido positiva, se revelou necessário confirmar se estávamos realmente na presença de *Streptococcus uberis*, procedeu-se à sementeira da cultura em estudo no meio de Slanetz e Bartley. Os cocos de Gram positivo; catalase e esculina negativos; e CAMP positivos foram identificados como *Streptococcus agalactiae*; e os CAMP negativos foram identificados pelo sistema *API*[®] 20 Strep (*BioMérieux*[®]).

Figura 2.24. Teste da catalase (original): a) reação positiva; b) reação negativa.

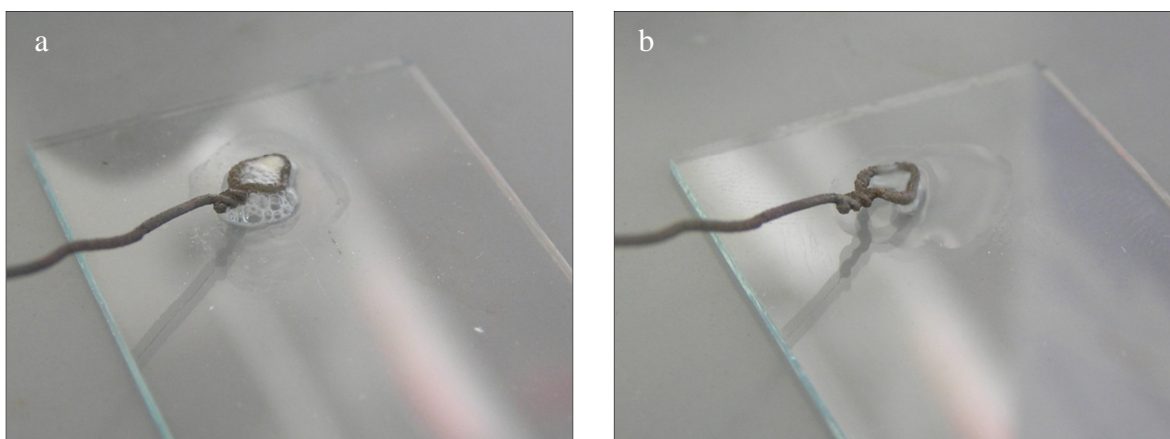


Figura 2.25. Teste da coagulase (original): a) reação positiva; b) reação negativa.

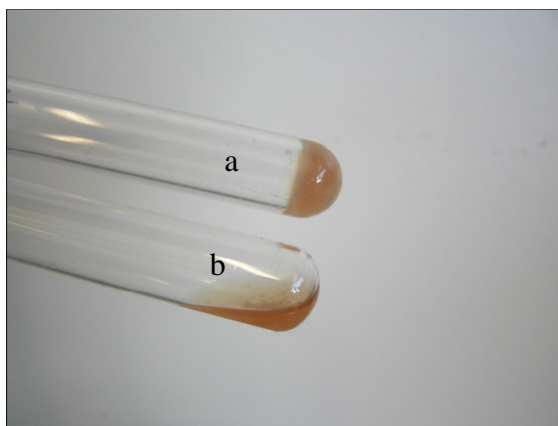


Figura 2.26. Teste da esculina (original): a) reação positiva; b) reação negativa.

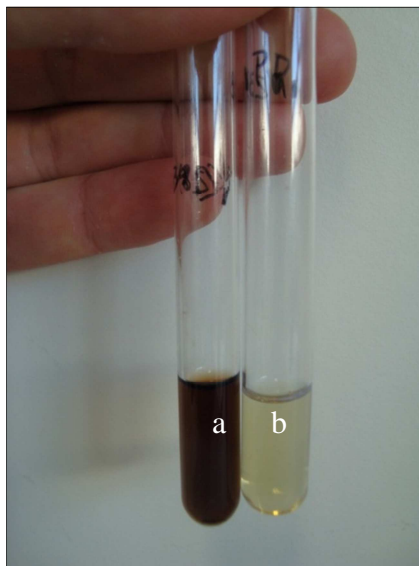
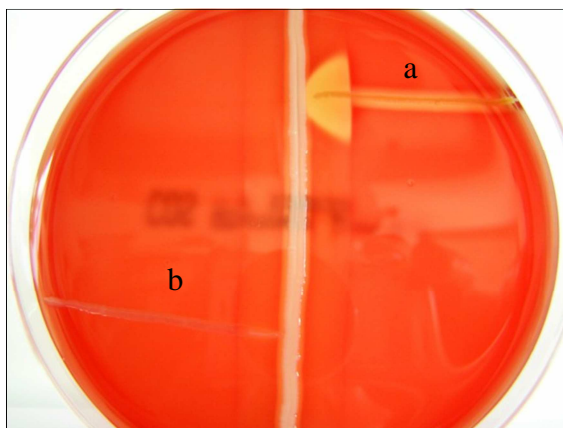
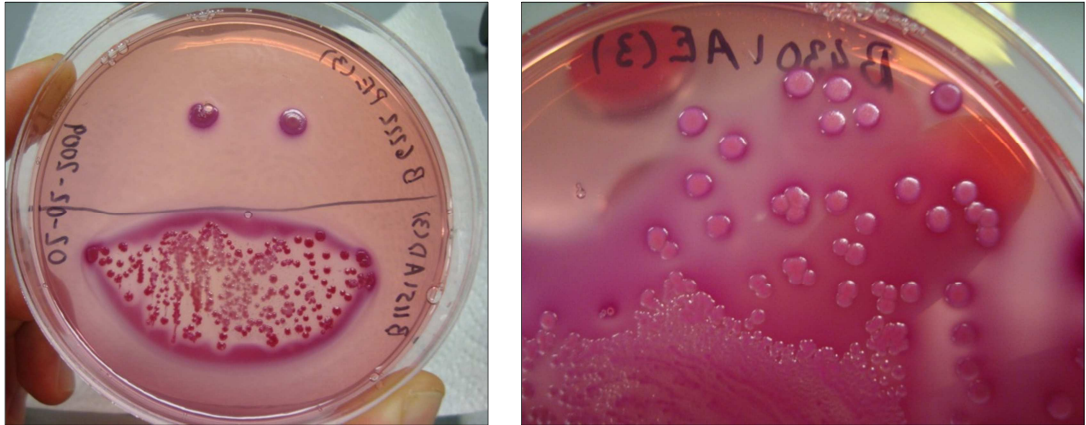


Figura 2.27. Teste de CAMP (original): a) reação positiva; b) reação negativa.



Os bacilos de Gram negativo foram submetidos ao teste da oxidase (*Merck*[®]). Os oxidase positivos foram identificados pelo sistema *API*[®] 20 NE (*BioMérieux*[®]); e os oxidase negativos que sugeriram a presença de *Escherichia coli* (*Merck*[®]; figura 2.28.) foram identificados por um conjunto de testes que constituem o IMViC (Indol, Metil-red, Voges Proskauer e Citrato). Os bacilos de Gram negativo, oxidase negativos e que, após a prova do IMViC, não se revelaram ser *Escherichia coli* foram identificados pelo sistema *API*[®] 20 E (*BioMérieux*[®]);

Figura 2.28. Colónias lactose positivas em agar MacConkey (original).



- iv. os bacilos de Gram positivo foram identificados como tal, não tendo sido alvo de outro tipo de análises de identificação;
- v. as algas ou as leveduras foram identificadas por observação microscópica a fresco, após coloração com azul de algodão (figura 2.29.).

Figura 2.29. Algas do género *Prototheca* (preparação a fresco com azul de algodão, x 1000; original).

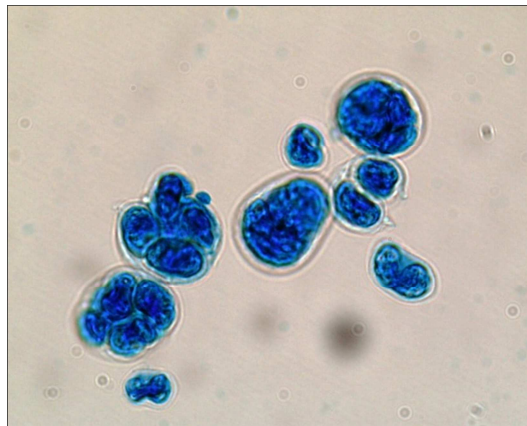
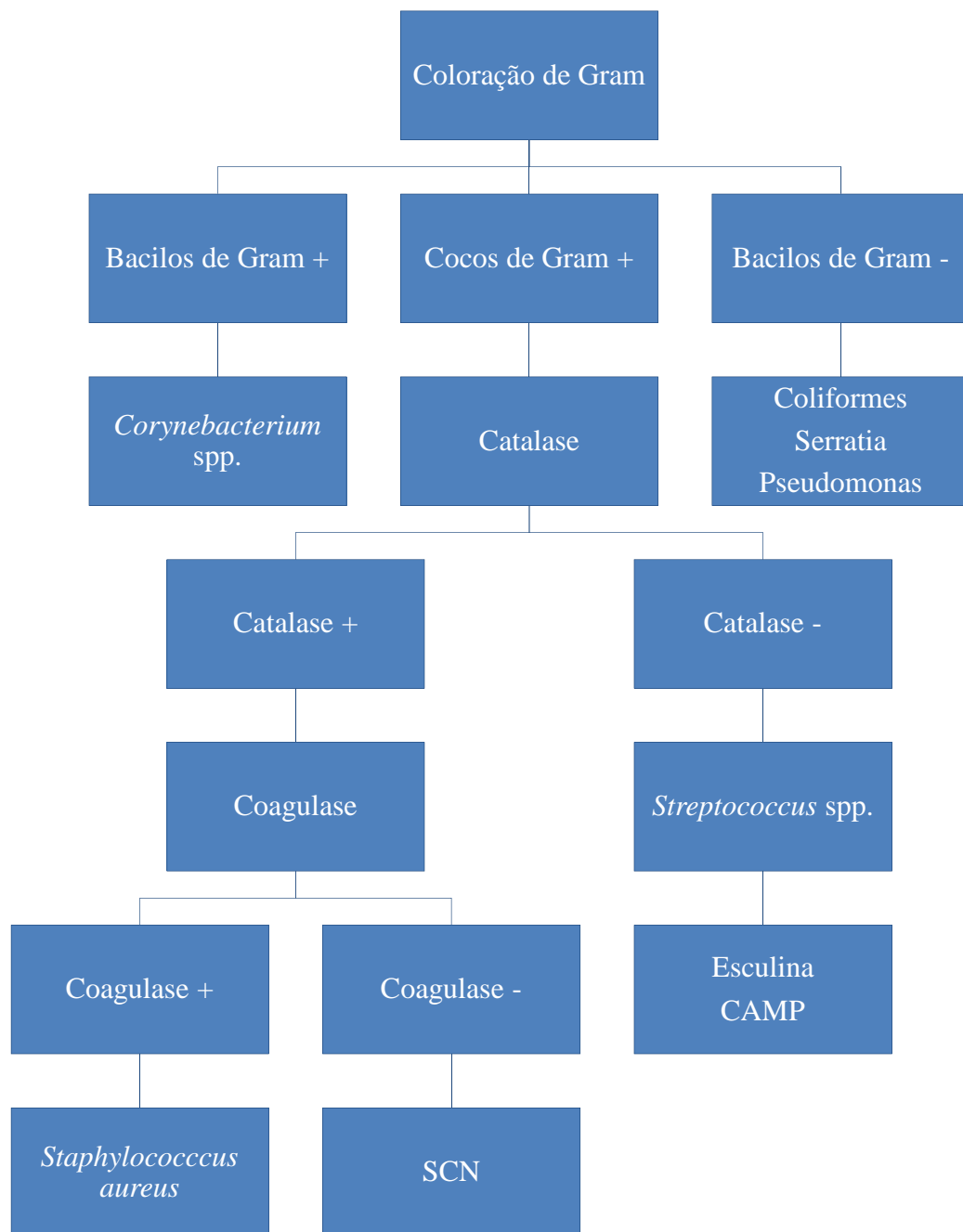


Figura 2.30. Identificação presuntiva de agentes causais de mastite bovina (Adaptado de NMC, 1999).



2.4. Estudo caso-controle: relação entre a CCS de casos de mastite clínica e de controles.

O emparelhamento dos casos (animais diagnosticados com mastite clínica) e controles (animais sem sinais visíveis de mastite clínica) foi feito de modo a que o caso e o controle em comparação apresentassem o mesmo número de lactação e a data de parto o mais coincidente possível (igual mês e ano, e, se possível, o mesmo dia de parto).

A análise das CS foi feita tendo em conta os três últimos registos de CCS, antes do diagnóstico da mastite clínica: última (CCS [▲]), penúltima (CCS [■]) e antepenúltima (CCS

[♦]) CCS. Para além disto, se, pelo menos, um dos valores da CCS do caso, passível de ser analisado, coincidiu ou esteve muito próximo (inferior a 10 dias) de um episódio anterior de mastite clínica deste, não se considerou este valor para análise.

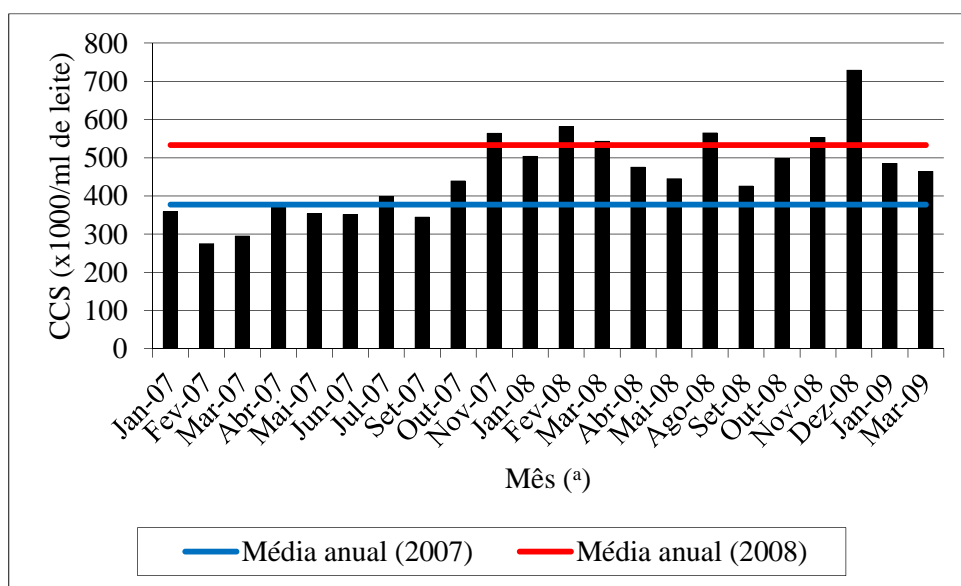
CAPÍTULO 3 — Resultados

3.1. Contagem de células somáticas

3.1.1. Caracterização estatística de CCS

O número médio de vacas contrastadas por mês em 2008 foi de 399 ± 21 e em 2007 foi de 319 ± 12 . Em 2008 ($533\,000 \pm 1075\,000$ células/ml de leite) a média anual de CCSLT foi 41,4 % mais elevada do que em 2007 ($377\,000 \pm 696\,000$). Para além disto, em 2008, a mediana e os valores mínimo e máximo foram de 202 000, de 6000 e de 14 542 000 células/ml de leite, respetivamente, enquanto em 2007 foram de 154 000, de 5000 e de 11 325 000 células/ml de leite, respetivamente. Na figura 3.1. encontra-se expressa as médias mensais de CCSLT de janeiro de 2007 a março de 2009; e as médias anuais de CCSLT de 2007 e de 2008. Em 2009, por comparação dos valores de CCSLT de janeiro (485 000 células/ml de leite) e de março (464 000 células/ml de leite) com iguais períodos dos dois anos anteriores, observou-se uma melhoria de 3,8 % e de 14,5 %, respetivamente, face a 2008. No entanto, os valores obtidos ainda se mantiveram muito acima (+35,1 % e +57,3 %, respetivamente) dos que já haviam sido registados em 2007.

Figura 3.1. Média anual de CCSLT e CCSLT mensais determinadas com base na média mensal de CCSVI.

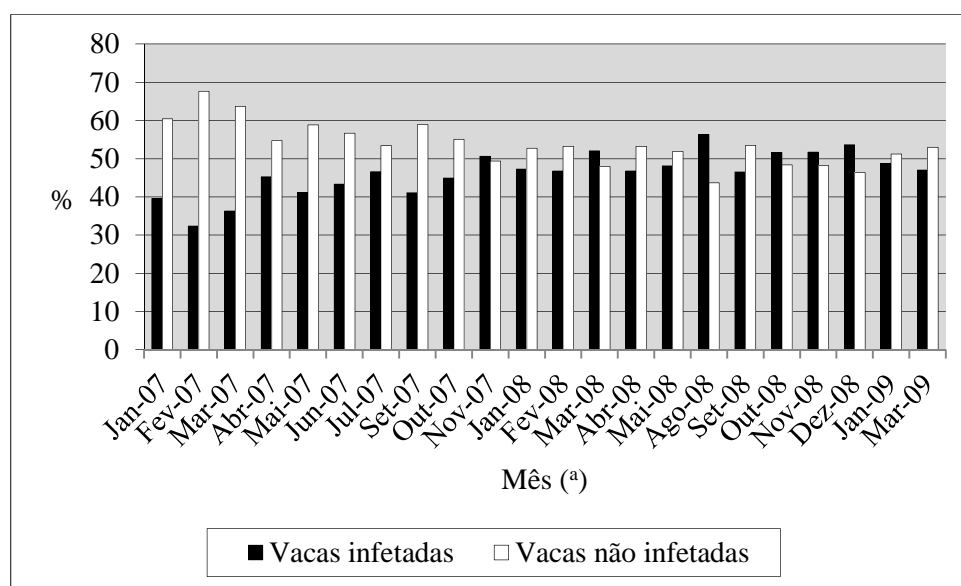


(a) Não foi possível caracterizar os meses de Ago-07, de Dez-07, de Jun-08, de Jul-08 e de Fev-09, devido à ausência de contraste leiteiro nesses meses.

3.1.2. Utilização da CCS como forma de aferição do estatuto de IIM de cada vaca

De uma forma geral, ao longo do ano de 2007, verificou-se um acréscimo e um decréscimo das proporções mensais de vacas infetadas e não infetadas, respetivamente. A partir de novembro de 2007 até março de 2009 houve uma menor oscilação média mensal (5,4 pontos percentuais [pp]) entre estes dois grupos em análise, comparativamente ao período entre janeiro de 2007 e outubro de 2007 (17,6 pp). Em termos de relação mensal «infecção» versus «não infecção», fevereiro de 2007 foi o melhor mês (32,4 % [$n = 100$] do efetivo infetado e 67,6 % [$n = 209$] não infetado) e agosto de 2008 o pior (56,4 % [$n = 226$] de vacas infetadas e 43,6 % [$n = 175$] não infetadas; figura 3.2.).

Figura 3.2. Percentagem mensal de vacas com e sem IIM.



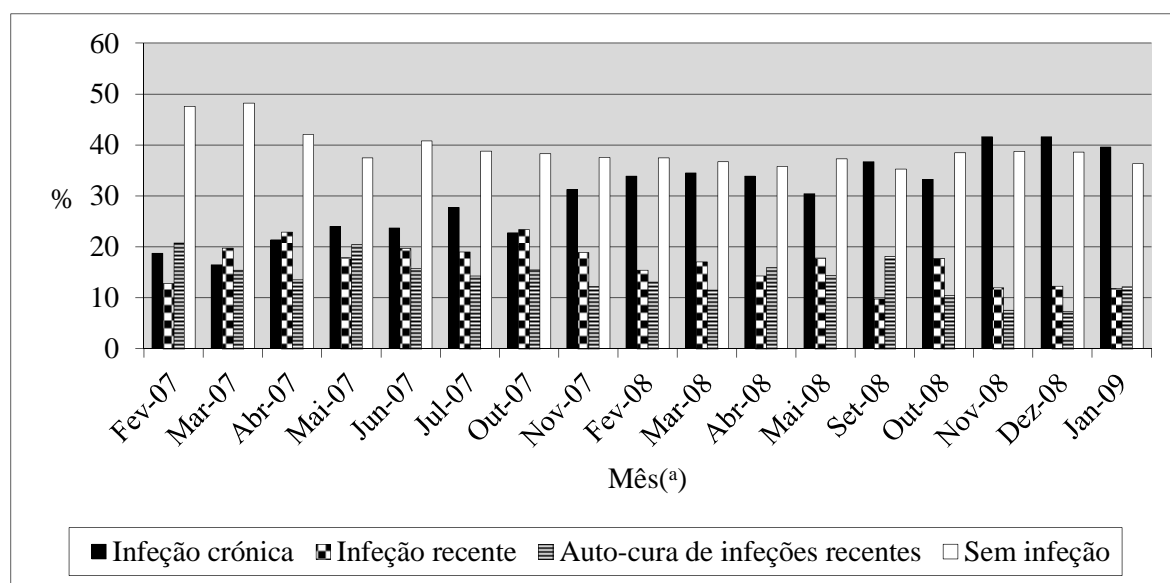
(a) Não foi possível caracterizar os meses de ago-07, de dez-07, de jun-08, de jul-08 e de fev-09, devido à ausência de contraste leiteiro nesses meses.

De fevereiro de 2007 a janeiro de 2009, a percentagem mensal de vacas com infeções crónicas tendeu a aumentar. Em fevereiro de 2008, a percentagem de vacas com infeções crónicas foi de 33,9 % ($n = 103$), refletindo um acréscimo de 80,3 % face ao mesmo período de 2007. Em janeiro de 2009 (39,6 % [$n = 133$]) verificou-se um novo acréscimo de 16,8 % relativamente a fevereiro de 2008 (figura 3.3.).

Em fevereiro de 2008, a percentagem de vacas sem infeção foi de 37,5 % ($n = 114$), isto é, teve uma variação negativa de 21,2 % comparativamente ao período homólogo de 2007. De fevereiro de 2008 a janeiro de 2009, esta percentagem voltou a diminuir, contudo, de forma menos acentuada (-3,2 %; figura 3.3.).

A percentagem mensal de vacas com infeções recentes foi mínima em setembro de 2008 (9,8 % [$n = 34$]) e máxima em outubro de 2007 (23,5 % [$n = 65$]), enquanto a relativa à auto-cura de infeções recentes foi mínima em dezembro de 2008 (7,4 % [$n = 27$]) e máxima em fevereiro de 2007 (20,8 % [$n = 60$]; figura 3.3.).

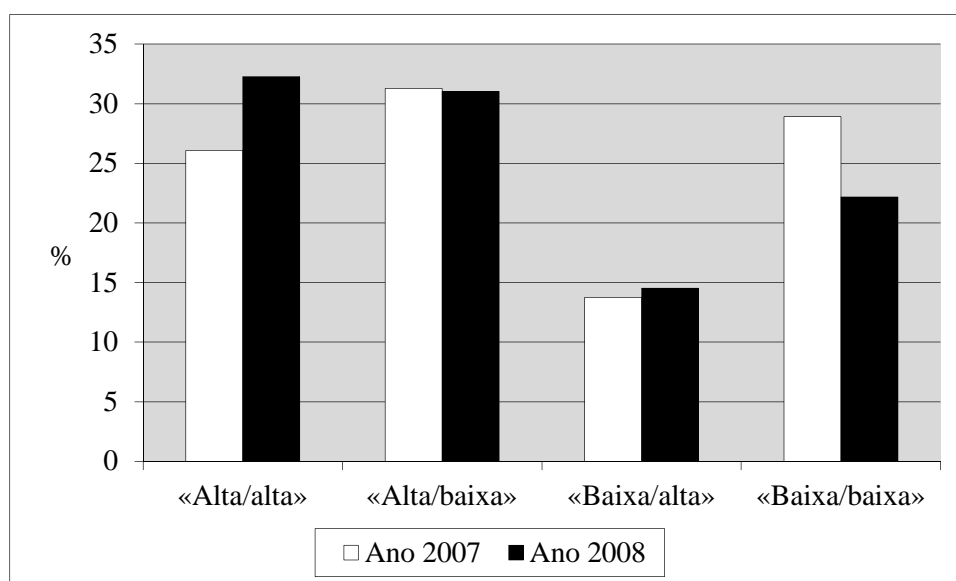
Figura 3.3. Percentagem mensal de vacas com IIM crónicas, recentes, auto-cura de infeções recentes e sem infeção.



(a) Não foi possível, com os dados disponíveis, gerar resultados para os meses de jan-07, de ago-07, de set-07, de dez-07, de jan-08, de jun-08, de jul-08, de ago-08, de fev-09 e de mar-09.

Relativamente à eficácia da terapêutica de secagem, grupo «alta/baixa», esta foi de cerca de 31 % em ambos os anos, registando-se apenas uma ligeira variação negativa (-1,0%) de 2007 para 2008 (figura 3.4.). Pelo contrário, as percentagens de vacas nos grupos «alta/alta» e «baixa/alta» foram de 32,3 % ($n = 80$) e de 14,5 % ($n = 36$), respetivamente, traduzindo um acréscimo de 23,8 % e de 5,8 %, respetivamente, face a 2007. O grupo «baixa/baixa» sofreu um decréscimo de 2007 para 2008 de 23,2 %, fixando-se em 2008 nos 22,2 % ($n = 55$; figura 3.4.).

Figura 3.4. Resultados de secagem de vacas.



3.2. Mastites clínicas

Taxa de mastites, percentagem do efetivo afetado e taxa de recorrência.

Em 2008, as taxas de mastites e de recorrência sofreram um aumento de 3,0 % e de 11,1 %, respetivamente, face ao ano anterior. Pelo contrário, a percentagem do efetivo afetado diminuiu 2,9 % (tabela 3.1.). Em 2009, por comparação do período entre 1 de janeiro e 16 de março com iguais períodos de 2007 e de 2008 verificou-se um agravamento da situação para os três parâmetros em estudo (tabela 3.2.).

Tabela 3.1. Taxa de mastites, percentagem do efetivo afetado e taxa de recorrência.

Parâmetro	Ano 2007	Ano 2008	Alvo ^(a)	Intervenção ^(a)
Taxa de mastites (%)	101	104	30	40
Percentagem do efetivo afetado (%)	41,5	40,3	20	25
Taxa de recorrência (%)	14,4	16,0	10	20

^(a) Valores propostos por Blowey & Edmondson (2010).

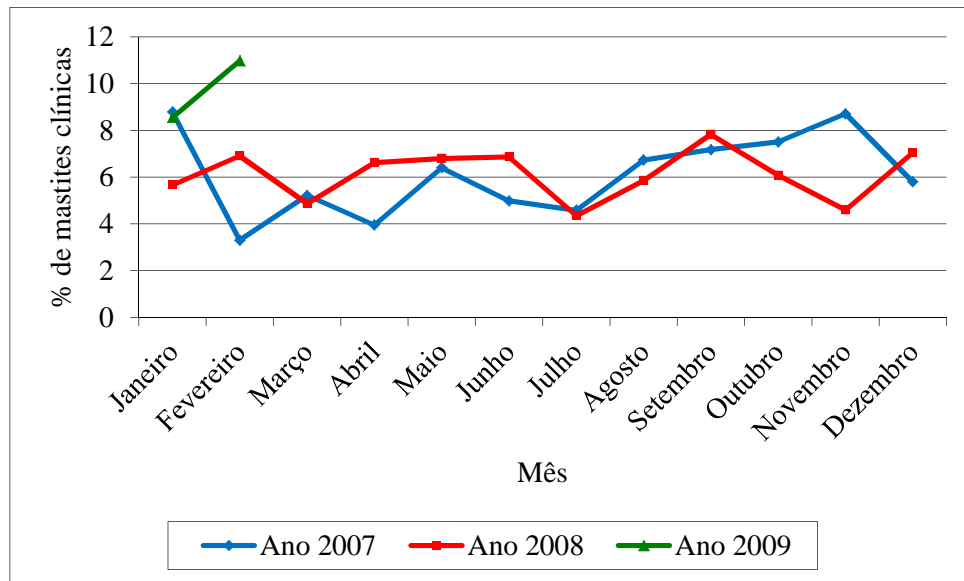
Tabela 3.2. Taxa de mastites, percentagem do efetivo afetado e taxa de recorrência no período entre 1 de janeiro e 16 de março.

Parâmetro	Ano 2007	Ano 2008	Ano 2009
Taxa de mastites (%)	20	26	39
Percentagem do efetivo afetado (%)	14,5	14,1	20,3
Taxa de recorrência (%)	1,5	4,0	9,8

Incidência mensal.

A incidência média de mastites clínicas (IMédMC) por mês foi igual em 2007 (6,1 % \pm 1,8 % [$n = 23$]) e em 2008 (6,1 % \pm 1,1 % [$n = 31$]). Em 2008, a incidência mínima de mastites clínicas (IMínMC; 4,3 % [$n = 22$]) e a incidência máxima de mastites clínicas (IMáxMC; 7,8 % [$n = 40$]) por mês foram 30,3 % e 11,4 % mais elevada e mais baixa, respetivamente, que no ano anterior. Em 2009, por comparação da incidência de mastites clínicas (IMC) de janeiro (8,6 % [$n = 45$]) e de fevereiro (11,0 % [$n = 57$]) com iguais períodos de 2007 e de 2008, registou-se um agravamento de 50,9 % e de 59,4 %, respetivamente, face ao ano transato; e de 233,3 % comparativamente a fevereiro de 2007 (figura 3.5.).

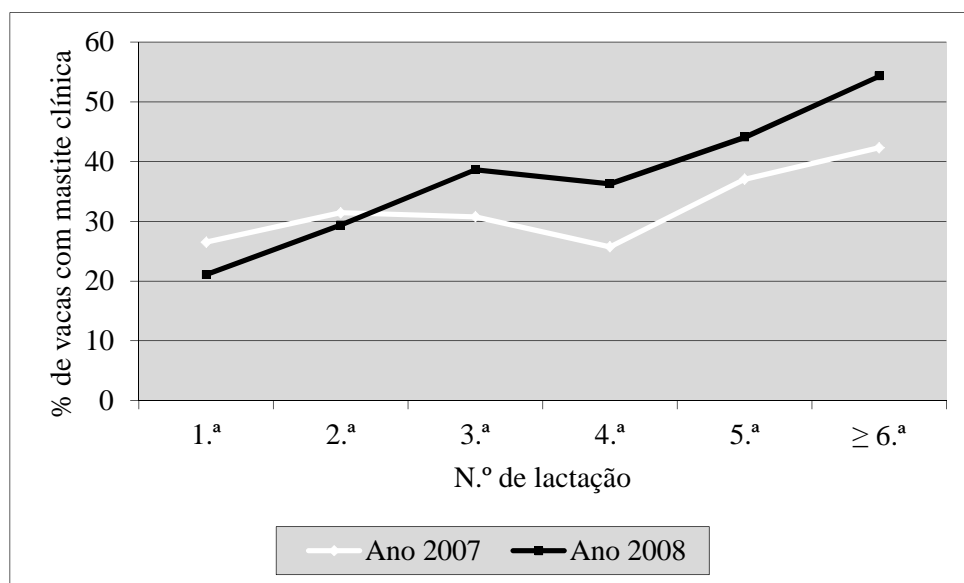
Figura 3.5. Incidência mensal de casos de mastite clínica.



Incidência por lactação.

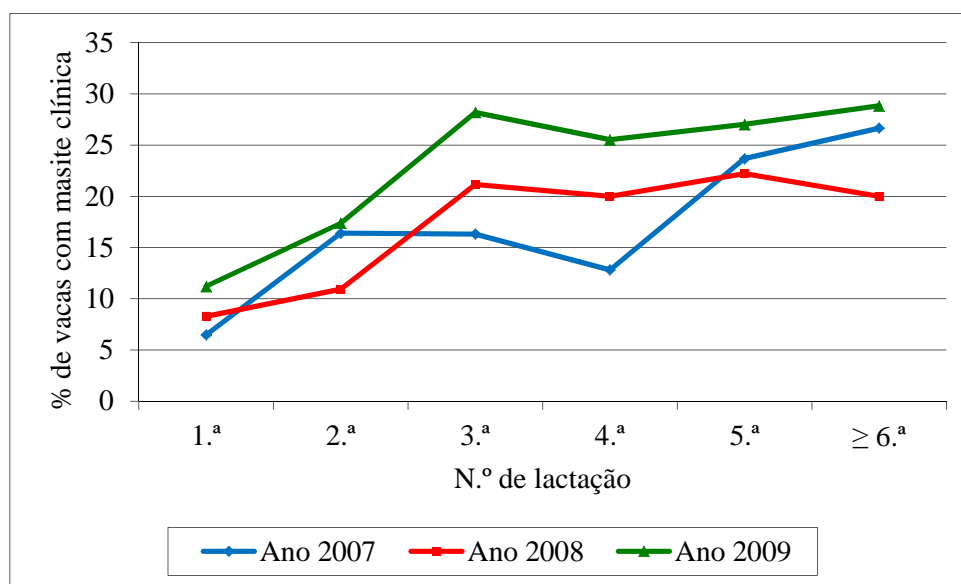
Em 2007 e 2008, as IMC por lactação foram semelhantes. De uma forma geral, verificou-se que o aumento do número de lactações foi acompanhado pelo aumento da IMC, à exceção da transição da 3.^a para a 4.^a lactação. A partir da 3.^a lactação, a IMC também aumentou de um ano para o outro. Em 2008, a IMédMC (37,3 % \pm 11,5 % [$n = 44$]) e a IMáxMC (54,3 % [$n = 65$]) por lactação foram 15,5 % e 28,8 %, respetivamente, mais elevadas que em 2007. Pelo contrário, a IMínMC (21,0 % [$n = 26$]) foi 18,3 % mais baixa que a do ano anterior (figura 3.6.).

Figura 3.6. Incidência de casos de mastite clínica por lactação.



Nos períodos entre 1 de janeiro e 16 de março de 2007, de 2008 e de 2009; a IMC por lactação teve o mesmo comportamento que já foi aqui enunciado, à exceção de em 2008 também ter-se registado uma ligeira quebra (-9,9 %) na transição da 5.^a para ≥ 6 .^a lactação. Nesse período, em 2009, a IMédMC (23,0 % $\pm 7,1$ % [$n = 19$]), a IMínMC (11,2 % [$n = 10$]) e a IMáxMC (28,8 % [$n = 28$]) foram 34,5 %, 34,9 % e 29,7 %, respetivamente, mais elevadas que no ano anterior; e 34,5 %, 72,3 % e 7,9 %, respetivamente, mais elevadas que em 2007 (figura 3.7.).

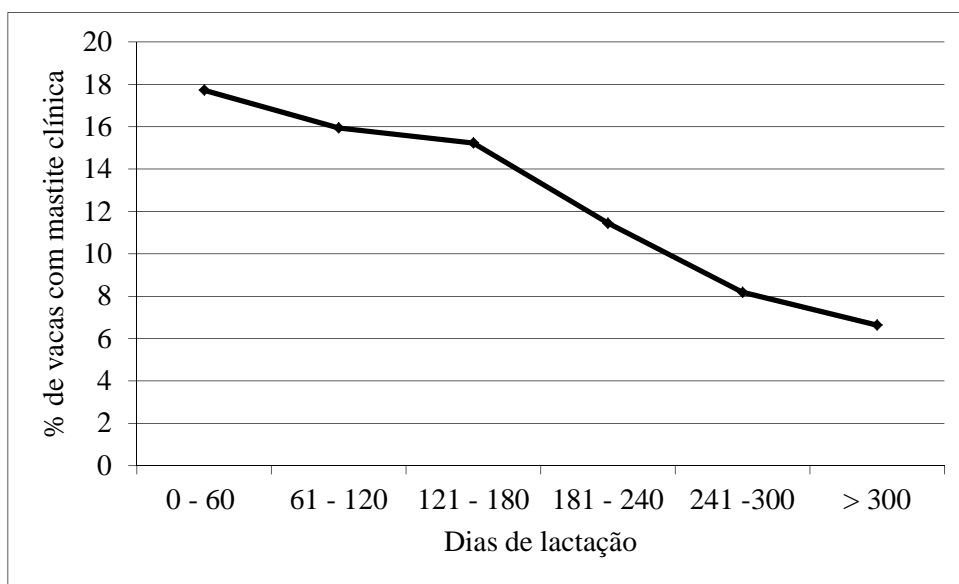
Figura 3.7. Incidência de casos de mastite clínica por lactação, no período entre 1 de janeiro e 16 de março.



Incidência por período de lactação (dias de lactação).

Apenas foi possível, com os dados disponíveis, gerar resultados para 2008. A IMC por períodos de lactação de 60 dias foi mais elevada nos primeiros 60 dias e, posteriormente, foi diminuindo com o aumento do número de dias pós-parto. A IMédMC, a IMínMC e a IMáxMC foram de 12,2 % $\pm 4,4$ % ($n = 57$), de 6,1 % ($n = 32$) e de 16,8 % ($n = 89$), respetivamente (figura 3.8.).

Figura 3.8. Incidência de casos de mastite clínica ao longo da lactação (ano de 2008).



3.3. Culturas microbiológicas

Mastites subclínicas

Em termos de mastites subclínicas foram colhidas e processadas laboratorialmente 46 amostras de leite (22 amostras no mês de janeiro e 24 amostras no mês de fevereiro), provenientes de um quarto; de 46 vacas; de várias lactações; em várias fases da lactação; e com IIM crônicas e recentes. Um e dois agentes microbianos foram isolados de 54,3 % e de 41,3 % destas amostras, respectivamente. A ausência de crescimento verificou-se em 4,3 % das amostras e não se observou a existência de amostras contaminadas. Nas culturas puras, os agentes etiológicos isolados com maior e menor frequência foram *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, respectivamente (tabela 3.3. e 3.4.).

No total (culturas puras e mistas) foram isolados 7 agentes etiológicos de mastite subclínica bovina. *Streptococcus uberis* e SCN foram os agentes mais vezes isolados, enquanto *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli* foram os menos vezes isolados.

Tabela 3.3. Resultados do processamento laboratorial de amostras de leite de casos de mastite subclínica.

Micro-organismo isolado/resultado laboratorial	Mastites subclínicas	
	<i>n</i>	%
<i>Streptococcus uberis</i>	9	19,6
SCN	7	15,2
<i>Prototheca</i> spp.	4	8,7
Bacilos de Gram +	4	8,7
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	2,2
Etiologia mista	19	41,3
Sem crescimento	2	4,3
Contaminado	—	—
Total	46	100,0

n — Número de amostras;

% — percentagem de amostras.

Tabela 3.4. Micro-organismos identificados nas culturas mistas de casos de mastite subclínica.

Etiologia mista	Mastites subclínicas	
	<i>n</i>	%
Bacilos de Gram +, SCN	4	21,1
SCN, <i>Streptococcus uberis</i>	4	21,1
Bacilos de Gram +, <i>Streptococcus uberis</i>	2	10,5
Bacilos de Gram +, <i>Prototheca</i> spp.	2	10,5
<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus uberis</i>	1	5,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	5,3
SCN, <i>Prototheca</i> spp.	1	5,3
SCN, SCN	1	5,3
SCN, (resultado inconclusivo)	1	5,3
<i>Streptococcus uberis</i> , <i>Prototheca</i> spp.	1	5,3
<i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus uberis</i>	1	5,3
Total	19	100,0

n — Número de amostras;

% — percentagem de amostras.

Mastites clínicas

As mastites clínicas de grau II (anexo 4) foram diagnosticadas em 148 quartos de 78 vacas. No entanto, apenas foram processadas amostras de leite de 35,1 % destes quartos e de 44,9 % destas vacas. As amostras de leite reportadas foram todas de quartos individuais. Isolaram-se um e dois agentes microbianos de 50,0 % e de 23,1 % destas amostras, respetivamente. Como amostras sem crescimento e contaminadas registaram-se 25,0 % e 1,9 %, respetivamente. Nas

culturas puras, *Streptococcus uberis* foi o principal micro-organismo isolado; e *Escherichia coli*, *Prototheca* spp. e *Streptococcus dysgalactiae* foram os menos vezes isolados (tabela 3.5. e 3.6.).

As mastites clínicas de grau III (anexo 4) foram identificadas em 11 quartos de nove vacas. Todavia, apenas foram enviadas para o laboratório amostras de leite de 63,6 % destes quartos e de 77,8 % destas vacas. Em todas estas amostras apenas se isolou um micro-organismo. *Escherichia coli* foi o agente etiológico predominante (tabela 3.5.).

No total (culturas puras e mistas de grau II e III; anexo 4) foram isolados 7 agentes etiológicos de mastite clínica bovina. *Streptococcus uberis* foi o agente mais vezes isolado, enquanto *Streptococcus dysgalactiae* e *Klebsiella* spp. foram os menos vezes isolados.

Tabela 3.5. Resultados do processamento laboratorial de amostras de leite de casos de mastite clínica.

Micro-organismo isolado/resultado laboratorial	Mastites clínicas					
	Grau II		Grau III		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>Streptococcus uberis</i>	12	23,1	—	—	12	20,3
SCN	6	11,5	—	—	6	10,2
Bacilos de Gram +	5	9,6	1	14,3	6	10,2
<i>Escherichia coli</i>	1	1,9	5	71,4	6	10,2
<i>Prototheca</i> spp.	1	1,9	—	—	1	1,7
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1,9	—	—	1	1,7
<i>Klebsiella</i> spp.	—	—	1	14,3	1	1,7
Etiologia mista	12	23,1	—	—	12	20,3
Sem crescimento	13	25,0	—	—	13	22,0
Contaminado	1	1,9	—	—	1	1,7
Total	52	100,0	7	100,0	59	100,0

n — Número de amostras;

% — percentagem de amostras;

Tabela 3.6. Micro-organismos identificados de culturas mistas de casos de mastite clínica.

Etiologia mista	Mastites clínicas (grau II)	
	<i>n</i>	%
<i>Prototheca</i> spp., SCN	4	33,3
SCN, <i>Streptococcus uberis</i>	3	25,0
Bacilos de Gram +, <i>Prototheca</i> spp.	1	8,3
Bacilos de Gram +, <i>Streptococcus uberis</i>	1	8,3
<i>Prototheca</i> spp., <i>Streptococcus uberis</i>	1	8,3
SCN, SCN	1	8,3
<i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus uberis</i>	1	8,3
Total	12	100,0

n — Número de amostras;

% — percentagem de amostras;

3.4. Estudo caso-controlo: relação entre a CCS de casos de mastite clínica e de controlos

A grande maioria dos animais utilizados neste estudo foram animais jovens, isto é, mais de 65 % dos pares caso-controlo foram vacas de 1.^a e de 2.^a lactação (tabela 3.7.). Em termos estatísticos, a diferença, em dias, entre as datas de partos de casos e de controlos encontra-se expressa na tabela 3.8. Relativamente às CCS, verificou-se que a média de CCS dos casos foi mais elevada do que a dos controlos. No entanto, as diferenças observadas apenas foram estatisticamente significativas, de acordo com os resultados do teste *t* de *student* ($p < 0,05$), para CCS [▲] e CCS [■] (tabela 3.9.).

Tabela 3.7. Distribuição dos pares caso-controlo por lactação antes do diagnóstico de mastite clínica.

Lactação	CCS [▲]		CCS [■]		CCS [◆]	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
1. ^a	42	38,5	29	31,2	21	24,4
2. ^a	29	26,6	34	36,6	36	41,9
3. ^a	17	15,6	15	16,1	12	14,0
4. ^a	6	5,5	5	5,4	5	5,8
5. ^a	7	6,4	6	6,5	7	8,1
6. ^a	7	6,4	2	2,2	3	3,5
7. ^a	1	0,9	2	2,2	2	2,3
Total	109	100,0	93	100,0	86	100,0

n — Número de pares caso-controlo;

% — percentagem de pares caso-controlo;

CCS [▲] — última contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica;

CCS [■] — penúltima contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica;

CCS [◆] — antepenúltima contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica.

Tabela 3.8. Caracterização estatística da variação, em dias, entre a data de partos de casos e de controles.

Parâmetro	CCS [▲]	CCS [■]	CCS [◆]
n	109	93	86
$\bar{x} \pm \sigma$	$7,4 \pm 7,0$	$7,5 \pm 6,8$	$7,5 \pm 6,6$
Mínimo	0	0	0
Máximo	25	25	25

n — número de pares caso-controle;

$\bar{x} \pm \sigma$ — média \pm desvio padrão;

CCS [▲] — última contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica;

CCS [■] — penúltima contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica;

CCS [◆] — antepenúltima contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica.

Tabela 3.9. Caracterização estatística das CCS de casos e de controles antes do diagnóstico de mastite clínica.

Parâmetro	CCS [▲]		CCS [■]		CCS [◆]	
	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle
n	109	109	93	93	86	86
$\bar{x} \pm \sigma$	$751,5^a$ $\pm 1365,1$	$336,5$ $\pm 493,8$	$524,4^a$ $\pm 881,5$	$310,0$ $\pm 448,7$	$366,8$ $\pm 544,9$	$294,0$ $\pm 523,1$
Mínimo	16	15	15	16	20	13
Máximo	7816	2753	4924	2926	2889	2694

n — número de animais;

$\bar{x} \pm \sigma$ — média \pm desvio padrão;

CCS [▲] — última contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica;

CCS [■] — penúltima contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica;

CCS [◆] — antepenúltima contagem de células somáticas antes do diagnóstico de mastite clínica.

^a ($p < 0,05$)

CAPÍTULO 4 — Discussão

Práticas de manejo.

De uma forma geral, nesta vacaria observaram-se determinados aspectos positivos e negativos que podem influenciar a saúde do úbere. Muitas das más práticas de manejo observadas foram corrigidas no período final deste estudo.

A alimentação de vitelos com leite de refugo cru (mastítico e/ou com antibiótico) é uma prática utilizada por muitos produtores de leite, por ser uma alternativa econômica ao leite de substituição e uma via de escoar um produto sem valor comercial (Bovine Alliance on Management and Nutrition [BAMN], 2008). Esta prática, embora não tivesse ou não parecesse ter influência direta na incidência de IIM desta exploração, atendendo às condições

de manejo que lá eram praticadas, pode, no entanto, contribuir para a infecção de vitelos por diversos agentes patogênicos — *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli*, etc. (Butler, Sickles, Johanns & Rosenbusch, 2000; Gao, Mutharia, Chen, Rahn & Odumeru, 2002; Stabel, Hurd, Calvente & Rosenbusch, 2004) — e para o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos. A infecção de vitelos por possíveis agentes patogênicos presentes no leite de refugo cru pode ser minimizada ou evitada não se alimentando os recém-nascidos com este leite, devido à sua elevada permeabilidade intestinal; impedindo-se que os vitelos tenham contato físico e, conseqüentemente, que mamem uns nos outros (Kesler, 1981); e recorrendo-se à pasteurização (Butler et al., 2000; Stabel et al., 2004; BAMN, 2008). Vários estudos (Butler et al., 2000; Stabel et al., 2004) já demonstraram que a pasteurização de leite de refugo foi ou poderá ser eficaz na prevenção de infecções de vitelos por diversos micro-organismos, muitas vezes presentes neste tipo de leite. Langford, Weary e Fisher (2003) demonstraram que a alimentação de vitelos com leite de refugo, contendo penicilina, levou ao aparecimento de bactérias intestinais resistentes aos antibióticos. O nível de resistência foi tanto maior quanto maiores foram as concentrações de penicilina no leite.

As CCS tendem a aumentar com os aumentos da temperatura e da humidade atmosféricas (Park et al., 2007; Bouraoui, Lahmar, Majdoub, Djemali, & Belyea, 2002). Para além disto, as vacas altas produtoras produzem uma grande quantidade de calor (Blowey & Edmondson, 2010) e de fluídos por dia (Blowey & Edmondson, 2010; Hughes, 2000; Hughes, 2001), o que pode contribuir ainda mais para elevar os níveis de temperatura e de humidade dos parques. A presença de aberturas laterais, de ventoinhas e de dispersores de água automáticos para controlar os níveis de *stress* dos animais; e a temperatura e a humidade dos parques, principalmente das camas, é extremamente importante (Hughes, 2001; Blowey & Edmondson, 2010). No entanto, devem ser tidos alguns cuidados com os dispersores de água automáticos, porque, ainda que contribuam para minimizar o *stress* dos animais pelo calor, podem favorecer o aumento dos níveis de humidade das camas. As explorações com vacas estabuladas em parques sujeitos a grandes oscilações de temperatura podem ser alvo de uma elevada incidência de mastites clínicas (Barkema et al, 1999). A temperatura e a humidade são dois dos fatores que influenciam a multiplicação dos micro-organismos nos materiais de cama (Ward et al., 2002). A superfície das camas deve, por isto, ter uma temperatura inferior a 15 °C e um nível de humidade inferior a 75 % (Hughes, 2001). A incorporação de cal hidratada nas zonas mais húmidas das camas favorece a absorção de humidade e a alcalinização do meio, contribuindo assim para que as camas se mantenham secas; e para que haja uma diminuição da viabilidade e da capacidade de multiplicação dos micro-organismos.

No entanto, de acordo com alguns estudos estes efeitos podem nem sempre se verificar (Ward et al., 2002) ou são muito limitados no tempo, isto é, podem durar apenas cerca de 24-48 horas (Hogan & Smith, 1997; Hogan et al., 1999; Hogan, Wolf & Petersson-Wolfe 2007).

A existência de duas salas de ordenha e a divisão dos animais por parques, em função da produção e da CCS, são extremamente úteis, porque evita que o leite de vacas infetadas entre em contacto com as unidades de ordenha para as não infetadas, e permite estabelecer uma sequência de ordenha que poderá contribuir para a redução da disseminação de IIM entre vacas durante a ordenha, respectivamente (Edmondson, 2001). A presença de *Staphylococcus aureus* nas tetinas de uma determinada unidade de ordenha pode resultar na sua transmissão às próximas seis a oito vacas ordenhadas pela mesma unidade (Blowey & Edmondson, 2010). Um estudo americano (Wilson, González & Sears, 1995) demonstrou que as explorações leiteiras que praticaram a separação de vacas infetadas por *Staphylococcus aureus*, quer pela sua ordenha em último lugar ou quer pela ordenha com unidades diferentes das que foram ordenhadas as vacas não infetadas, tiveram uma menor prevalência de mastites por *Staphylococcus aureus*, comparativamente às que não tiveram por hábito esta prática. Nesta exploração, a ordem de ordenha, embora se possa considerar aceitável, poderia ser melhorada, se as vacas recém-paridas (até aos 20 a 30 dias pós-parto) fossem o 1.º grupo a ser ordenhado (Jones & Ohnstad, 2002; Ohnstad, 2005).

A condução das vacas para a sala de ordenha; e a sua atitude no parque de espera e durante a ordenha devem ser avaliadas, porque vacas com sinais crónicos de *stress*, de medo e/ou de desconforto durante estas operações podem, mesmo com uma adequada preparação dos tetos e/ou dos úberes antes da ordenha, apresentar uma ordenha inadequada e uma maior predisposição para mastites (Rushen, Passilé & Munksgaard, 1999; NMC, n. d. 4) As hormonas libertadas na corrente sanguínea durante períodos de *stress* podem interferir com o reflexo normal para a descida do leite e, ainda, causar imunossupressão (Lippolis, 2008; Corbett, 2009; NMC, n. d. 4). Vários estudos já mostraram que as vacas são capazes de distinguir entre tratadores que as submetem a maus tratos e a bons tratos (Munksgaard, Passilé, Rushen, Thodberg & Jensen, 1997; Rushen et al., 1999). Um estudo norte-americano demonstrou que as explorações com vacas com uma maior quantidade de leite retido no úbere após a ordenha evidenciaram uma maior prevalência de IIM por coliformes (Bartlett, Miller, Lance, & Heider, 1992). As vacas relutantes à ordenha tendem a ser inadequadamente preparadas pelos ordenhadores e apresentam maior risco de *liner slip*, por exemplo, ao tentarem escoicear as unidades de ordenha (Blowey & Edmondson, 2010).

O grau de higiene das vacas pode muitas vezes estar associado à causa do aumento da incidência de mastites numa exploração leiteira. A consistência das fezes (Hughes, 2001;

Ward et al., 2002); a arquitetura e o grau de higiene dos cubículos, dos parques e/ou dos locais de passagem dos animais (Hughes, 2000; Hughes, 2001); o manejo das camas e dos materiais das camas (Hughes, 2001; Ward et al., 2002; Schreiner & Ruegg, 2003); a ventilação dos parques; os pelos das caudas e dos úberes (Hughes, 2001); a fase da lactação (Ward et al., 2002); a densidade animal; os padrões de dominância entre os animais; e o número de ordenhas ou o número de vezes que os animais são movimentados para outras operações de manejo (Schreiner & Ruegg, 2003), constituem exemplos de fatores que podem influenciar o estado de higiene dos animais. Um estudo holandês demonstrou que as explorações com baixas CCSLT estiveram associadas a melhores condições de higiene; e apresentaram vacas mais limpas e umas maiores higiênes das instalações e dos diversos equipamentos (Barkema et al., 1998b). Um estudo britânico (Breen et al., 2009) mostrou que as vacas com úberes muito sujos estiveram em maior risco de desenvolver mastites clínicas.

O aumento do número de ordenhas diárias, para além de favorecer o aumento da produção de leite, pode ter um impacto positivo ou negativo na saúde do úbere. Por um lado, aumenta a probabilidade de remoção de qualquer micro-organismo que possa estar a causar IIM (Blowey & Edmondson, 2010), favorece a redução da CCS e das perdas de leite que algumas vacas podem exibir entre ordenhas (Oweltjes et al., 2007); e por outro lado, pode predispor para IIM, visto que a máquina de ordenha é considerada um fator de risco para mastites, sobretudo se não estiver a funcionar correctamente (Blowey & Edmondson, 2010). Determinados estudos (Waterman, Harmon, Hemken & Langlois, 1983; Smith et al., 2002; Oweltjes et al., 2007) demonstraram que explorações que praticaram três ordenhas diárias tenderam a apresentar CCS mais baixas do que as que praticaram apenas duas ordenhas diárias. No entanto, num destes estudos (Waterman et al., 1983) não se verificaram diferenças significativas em termos de novas IIM entre vacas com duas ou três ordenhas por dia. Numa exploração leiteira norte-americana, um grupo de investigadores demonstrou que vacas com seis ordenhas diárias nos primeiros 21 dias de lactação apresentaram CCS mais baixas do que as suas congéneres submetidas a três ordenhas diárias, e este efeito, embora mais evidente nos primeiros 21 dias, tendera em manifestar-se durante toda a lactação (Dahl, et al., 2004). No presente trabalho, de acordo com os relatos do produtor, as vacas com seis ordenhas por dia apresentaram menos casos de mastite clínica comparativamente às com três ordenhas por dia (resultados não apresentados). O estabelecimento de um número de ordenhas diárias ideal nem sempre se afigura como uma tarefa fácil. O preço do leite, da alimentação e da mão de obra; a carga de trabalho do produtor, no caso de ser este a executar a ordenha; e as questões relacionadas com a saúde e o bem-estar dos animais de produção devem ser todos tidos em conta na escolha do melhor compromisso em termos de frequência de ordenha.

Relativamente à ordenha e seus procedimentos, a presença de um ordenhador por ordenha, sobretudo na sala A, e sendo este responsável não só por esta operação, mas também por ir buscar as vacas aos parques, pode ter contribuído para algumas das más práticas de ordenha que foram observadas. Segundo Ohnstad (2005), na maioria das explorações leiteiras, os ordenhadores estão sempre em constante pressão para ordenharem cada vez mais vacas no menor tempo possível e, muitas vezes, estão ainda encarregues da realização de outras tarefas, no decorrer desta prática. Um ordenhador médio necessita de despende, pelo menos, cerca de 60 segundos/vaca durante a ordenha, o que corresponde à ordenha de 60 vacas/hora. Um bom ordenhador, com experiência e já rotinado, necessitará de, pelo menos, 45 segundos/vaca, o que corresponde à ordenha máxima de 80 vacas/hora. Quando um ordenhador refere ou se constata que ele consegue ordenhar um número de vacas por hora muito superior a este, o produtor deverá ficar atento, porque muitas das boas práticas de ordenha poderão não estar a ser realizadas.

A utilização de luvas durante a ordenha, as quais devem ser lavadas, desinfetadas e/ou substituídas regularmente, constitui uma das boas práticas de ordenha. A superfície das mãos apresenta muitas vezes calos e/ou rugas o que torna difícil a sua correta higienização e desinfecção, podendo deste modo o ordenhador contribuir para a disseminação de IIM, principalmente por agentes contagiosos, entre vacas durante a ordenha (Blowey & Edmondson, 2010; Jones & Ohnstad, 2002; Ruegg, 2004; Ohnstad, 2005). Um estudo finlandês (Haveri et al., 2008), mostrou que a maioria das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de locais extramamários, nos quais se incluíram, entre outros, as mãos e as narinas dos ordenhadores, foram idênticas às que foram isoladas de casos de mastite bovina. No entanto, dois estudos britânicos (Peeler et al., 2000; O'Reilly, Green, Peeler, Fitzpatrick & Green, 2006) também já demonstraram que a utilização de luvas durante a ordenha esteve diretamente correlacionado com a incidência de casos de mastite.

A lavagem dos tetos e/ou dos úberes no parque de espera, por meio de jatos de água de dispersão automática, ou na sala de ordenha deve ser evitada, porque é um fator de risco para mastites (Schukken, Grommers, Van De Geer, Erb & Brand, 1991). Quando as vacas entram na sala de ordenha com os tetos e/ou úberes demasiadamente sujos, apenas os tetos devem ser lavados (Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 4) O úbere, mesmo que muito sujo, não deve ser lavado, porque é difícil assegurar a sua correta secagem antes da ordenha (NMC, n. d. 4.). Quando o úbere está molhado, após a acoplagem da unidade de ordenha, a água pode escorrer e acumular-se no topo das tetinas, aumentando, assim, o risco de contaminação do leite (aumento do teor bacteriano do leite), de ocorrência de *liner slip* e de aparecimento de novas IIM (Blowey & Edmondson, 2010). Para além, se necessário, da lavagem dos tetos,

deve proceder-se à eliminação dos primeiros jatos de leite, a *pre-dipping* e à secagem dos tetos antes da acoplagem das unidades de ordenha (Jones & Ohnstad, 2002; Ruegg, 2004; Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 4.).

A inspeção dos primeiros jatos de leite, de cada vaca, antes da ordenha é um procedimento exigido pela UE aos produtores de leite de todos os estados membros (Commission Directive 89/362/EEC). A eficácia do *pre-dipping* já foi demonstrada por vários investigadores (Pankey, Wildman, Dreschler & Hogan, 1987; Gleeson, O'Brien, Flynn, O'Callaghan & Galli, 2009), no entanto, outros (O'Reilly et al., 2006), também já constataram que esta prática pode também estar associada a uma maior incidência de mastites clínicas comparativamente à limpeza a seco dos tetos. A secagem dos tetos, com toalhetes de papel ou de pano individuais por quarto, tem por objetivo não só evitar que restos de *pre-dip* entrem no tanque de leite, mas também estimular o reflexo para a descida do leite e minimizar a ocorrência de *liner slip* (Jones & Ohnstad, 2002; Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 4.) Um estudo britânico realizado em 482 explorações demonstrou que as que tiveram por hábito secar os tetos das vacas após a lavagem apresentaram menor risco de mastite clínica comparativamente às que não procederam desta forma (O'Reilly et al., 2006).

A permanência das unidades de ordenha nas vacas para além do tempo devido verificou-se em determinados momentos, porque o ordenhador nem sempre se encontrava presente na sala de ordenha. As unidades de ordenha devem ser removidas o mais cedo possível, após a ordenha do último quarto, e sempre com o vácuo desligado, de modo a minimizar-se a ocorrência de sobreordenha (Jones & Ohnstad, 2002; Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 4). Um estudo norte-americano (Natzke, Everett & Bray, 1982) demonstrou que a sobreordenha pode levar ao aumento do número de quartos infetados em vacas já previamente infetadas. Para além disto, a remoção das unidades de ordenha também não deve ocorrer demasiado cedo, pois, poderá contribuir para o aumento da quantidade de leite residual no úbere e, consequentemente, o desenvolvimento de mastites clínicas em quartos/vacas subclínicamente infetados/infetadas poderá ser favorecido (Edmondson, 2001; Blowey & Edmondson, 2010). As salas de ordenha que dispõem da funcionalidade de remoção automática das unidades de ordenha devem tê-la sempre ativada e corretamente calibrada.

O *liner slip* foi um fenómeno que se observou no decorrer da ordenha desta exploração, devido provavelmente à ordenha de vacas com os tetos húmidos (Edmondson, 2001; NMC, n. d. 3). Esta condição é considerada um fator de risco para mastites (Bartlett et al. 1992; Baxter, Rogers, Spencer & Eberhart, 1992, Blowey & Edmondson, 2010; NMC, n. d. 4) não devendo ocorrer em mais de 5 % das vacas em ordenha (Ohnstad, 2005; Blowey & Edmondson, 2010),

e quando se verificar, os ordenhadores devem promover à sua correção imediata (Bartlett et al. 1992).

A desinfecção das tetinas entre vacas durante a ordenha era apenas feita numa das salas de ordenha (sala B), por imersão numa solução de hipoclorito de sódio durante alguns segundos. Este procedimento, embora possa contribuir para a redução do número de micro-organismos, dificilmente consegue impedir eficazmente a disseminação destes entre vacas durante a ordenha (Jones & Ohnstad, 2002). Como alternativa a esta solução poderia usar-se ácido peroxiacético (Jones & Ohnstad, 2002) ou recorrer-se ao sistema de *back-flushing*⁹ (Jones & Ohnstad, 2002; Blowey & Edmondson, 2010). O ácido peroxiacético, presente em muitos produtos disponíveis comercialmente, atua mais rapidamente do que o hipoclorito de sódio (Jones & Ohnstad, 2002). O *back-flushing* das tetinas com água a 74 °C durante três minutos ou a 85 °C durante cinco segundos é capaz de garantir a sua esterilização (Jones & Ohnstad, 2002; Blowey & Edmondson, 2010).

No final da ordenha observaram-se várias alterações na condição física dos tetos que fizeram suspeitar que a máquina de ordenha poderia não estar a funcionar corretamente, apesar de ser revista com alguma periodicidade, e/ou que os ordenhadores não estariam a usá-la devidamente. A presença de tetos congestionados, de tetos com anel visível na base e as lesões de HEDT são disto um bom exemplo (Jones & Ohnstad, 2002). A sobreordenha, como já foi aqui referido, ocorreu com alguma frequência nesta exploração e, como tal, poderia ser a principal causa de muitas destas lesões (Ohnstad, 2006). Um estudo de campo português (Sousa, 2008) mostrou a existência de uma correlação positiva entre a HEDT e o risco de mastite; e este risco foi tanto maior quanto maior fora o grau de HEDT. Um estudo experimental dinamarquês demonstrou que a sobreordenha está associada a um aumento da espessura da parede do teto após a ordenha (Paulrud, Clausen, Andersen, & Rasmussen, 2005). Para além disto, uma elevada pressão de vácuo, o mau funcionamento dos pulsadores, as tetinas com dimensões inadequadas para os tipos de tetos e as unidades de ordenha demasiadamente pesadas constituem também exemplos de outros fatores que podem predispor para este tipo de lesões (Ohnstad, 2006).

O *post-dipping* é um procedimento pós-ordenha bastante eficaz na redução de novas IIM por muitos agentes de mastite bovina (Oliver et al., 1990; Boddie & Nickerson, 1997), sendo um dos cinco pontos do plano de controlo de mastites. Este procedimento deve ser aplicado a todas as vacas em lactação, de todas as explorações (Jones & Ohnstad, 2002; Hillerton & Berry, 2005). No entanto, determinados estudos (Schukken et al. 1989b; Barkema et al., 1999; Peeler et al., 2000) também já demonstraram que esta prática pode contribuir para uma maior

⁹ sistema automático presente em algumas salas de ordenha para desinfecção das tetinas entre vacas durante a ordenha (NMC, n. d. 3).

incidência de mastites clínicas em explorações com baixas CCSLT. Uma possível explicação para este facto poderá ser que a contínua aplicação de um *post-dip* poderá conduzir a uma redução da prevalência de IIM por agentes «menores» que colonizam o canal do teto e que poderão estar associados à prevenção de IIM por agentes «maiores» (Rainard & Poutrel, 1988).

Este trabalho foi realizado apenas numa exploração leiteira e os pressupostos da terapêutica de secagem, que lá eram praticados, não permitiram gerar resultados relativamente à eficácia e/ou aos benefícios desta opção relativamente à opção não tratamento. No entanto, tendo em conta os resultados de vários estudos a opção terapêutica de secagem é melhor do que a opção não tratamento no período seco (Woolford, 1998; Berry & Hillerton, 2002b). Nestes estudos (Woolford et al., 1998; Berry & Hillerton, 2002b;) a terapêutica de secagem mostrou ser mais eficaz na redução da incidência de novas IIM e de mastites clínicas durante o período seco, ao parto e durante a lactação comparativamente à opção não tratamento. Em termos de modalidade terapêutica de secagem, alguns estudos (Godden et al. 2003; Berry & Hillerton, 2007; Bradley et al. 2010) demonstraram que a administração intramamária de um antibiótico seguido de um selante de tetos é preferível em detrimento da administração de apenas antibiótico intramamário. Estes estudos demonstraram que os quartos ou as vacas que foram secas com a combinação intramamária de um antibiótico seguido de um selante de tetos apresentaram uma maior probabilidade de cura ou de não se isolarem agentes patogénicos de amostras de leite no pós-parto (Bradley et al. 2010); um menor risco ou incidência de IIM e/ou de mastites clínicas durante o período seco e na fase inicial da lactação (Godden et al. 2003; Berry & Hillerton, 2007; Bradley et al. 2010); e CCS mais baixas nos primeiros dias após o parto comparativamente aos quartos ou às vacas que foram secas somente com um antibiótico intramamário.

CCS

O limiar para deteção de IIM ao nível da vaca, com base nas CCS provenientes de amostras de leite compostas, foi o das 200 000 células/ml de leite, porque é o valor que garante a melhor combinação de sensibilidade (73 %) e de especificidade (86 %) (Dohoo, 2001; Bradley & Green, 2005).

De uma forma geral, as CCSLT desta exploração aumentaram de 2007 para 2008 e as IIM crónicas também tenderam em aumentar com o passar do tempo. No entanto, não se observaram grandes alterações de manejo que possam explicar este aumento, à exceção de em 2008 muitas vacas com elevadas CCS terem permanecido na exploração durante mais tempo,

em virtude do bom preço do leite pago ao produtor durante grande parte desse ano. Esta medida é desaconselhada, pois, pode ter repercussões drásticas em termos de saúde do úbere. As vacas com elevadas descargas celulares são consideradas como estando infetadas e, apesar da ordem de ordenha desta exploração ter sido considerado aceitável, a transmissão às não infetadas poderia ter ocorrido durante esta prática, como alguns estudos já demonstraram (Edmondson, 2001; Wilson et al., 1995). Os agentes contagiosos são os que normalmente estão associados a casos de mastite subclínica e crónica, e, por conseguinte, são muitas vezes os responsáveis por as CCS manterem-se elevadas durante mais tempo. Durante a recolha de amostras de leite a vacas com IIM não foram isolados agentes contagiosos. No entanto, não é de excluir a sua presença, dado que as colheitas foram realizadas durante um curto período de tempo e os agentes contagiosos, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* podem ter um padrão de eliminação intermitente do úbere bovino, devido à sua capacidade de infetar e de sobreviver no interior de células (Sears et al., 1990; Hensen, Pavičić, Lohuis & Poutrel, 2000; NMC, n. d. 1). Para além disto, e embora não corresponda ao padrão epidemiológico característico dos agentes ambientais, *Streptococcus uberis* (Phuektes et al., 2001; Blowey & Edmondson, 2010), *Escherichia coli* (Döpfer, Barkema, Lam, Schukken & Gaastra, 1999; Bradley & Green, 2000) e *Prototheca* spp. (González, 1996; Roesler & Hensel, 2003) têm também já sido implicados em casos de mastite subclínica e crónica.

Os resultados de secagem das vacas mostraram que a situação piorou de 2007 para 2008. Em 2008, obteve-se uma maior percentagem de vacas nos grupos «alta/alta» e «baixa/alta», e uma menor no grupo «baixa/baixa», comparativamente a 2007. Este agravamento poderia ter estado relacionado, como já foi aqui referido, com a permanência durante mais tempo na exploração de vacas com CCS elevadas em 2008. A diminuição da taxa de cura de IIM provenientes do final da lactação no pós-parto poderia ter resultado da ineficácia do antibiótico em eliminar infeções crónicas, sobretudo se no parênquima mamário já existissem nódulos ou abscessos. Um estudo britânico mostrou que, por volta dos 60 dias antes da data prevista para a secagem, vacas com $CCS > 199\,000$ células/ml de leite apresentaram maior risco de na fase inicial da lactação seguinte as suas CCS puderem aumentar em contraste com as que tinham $CCS \leq 199\,000$ células/ml de leite (Green, Bradley, Medley & Browne, 2008). Um estudo alemão, sobre fatores que podem influenciar a eficácia da antibioterapia de secagem, demonstrou que as vacas que foram secas com lesões crónicas ou com lesões crónicas mais exuberantes no parênquima mamário apresentaram menores taxas de cura bacteriológica no pós-parto, e maior risco de mastites clínicas na fase inicial da lactação seguinte, comparativamente às que não evidenciaram a presença de lesões crónicas ou que apresentaram lesões crónicas menos extensas (Gundelach, Kalscheuer, Hamann &

Hoedemaker, 2011). As algas do género *Prototheca*, embora tenham sido isoladas de casos de mastite clínica e de mastite subclínica desta exploração, num período diferente ao dos dados que foram utilizados para avaliar a eficácia da terapêutica de secagem, poderiam já estar presentes nesse período devido à sua ubiquidade. De uma forma geral, estas algas são resistentes à maioria dos antimicrobianos que normalmente são usados no tratamento de mastites (Filippsen, Moreira, Sakashita & Bittencourt, 1999; Bexiga et al., 2003). No entanto, não deve também ser excluída a hipótese de alguns animais se terem curado durante o período seco e, posteriormente, se terem reinfectado no início da lactação seguinte, antes do primeiro contraste leiteiro pós-parto. A reinfeção durante o período seco teria sido a hipótese menos provável devido à utilização de um selante de tetos. Um estudo neozelandês demonstrou com recurso ao raio x que o selante de tetos foi capaz de permanecer, pelo menos, em parte, na cisterna do teto durante cerca de 100 dias (Woolford et al., 1998). Todavia, num estudo britânico, sobre a eficácia da terapêutica de secagem, não se conseguiu recuperar no pós-parto material de selante de tetos de todos os quartos. E entre os grupos de tratamento com selante de tetos, foi recuperado maior quantidade deste material em quartos tratados somente com selante de tetos comparativamente aos que foram tratados com a combinação intramamária de antibiótico e selante de tetos. No entanto, os autores não observaram diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos de tratamento, em termos de probabilidades de cura ou de isolamento de agentes patogénicos de amostras de leite no pós-parto, e de incidência de mastites clínicas durante o período seco e os primeiros 100 dias de lactação. Os resultados desse estudo questionam, de certa forma, a capacidade do selante de tetos exercer eficazmente o seu efeito tampão na presença de antibiótico (Bradley et al., 2010).

Mastites clínicas

A taxa de mastites e a percentagem do efetivo afetado nesta exploração foram muito superiores aos valores alvo e de intervenção propostos por Blowey e Edmondson (2010). Em 2008, as taxas de mastite e de recorrência foram ligeiramente superiores às de 2007. Isto poderia ter sucedido, como já foi aqui referido, porque em determinados períodos de 2008 vacas com CCS elevadas foram mantidas durante mais tempo na exploração.

Um estudo holandês demonstrou que casos de mastite clínica bovina por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e por *Sptreptococcus* spp. foram precedidos por CCS elevadas (de Haas et al., 2002). Do mesmo modo, outro estudo holandês mostrou que vacas com elevadas CCS estiveram em maior risco de contraírem mastite clínica

do que as que apresentaram baixas CCS (van den Borne et al. 2011). Em 2009, no período entre 1 de janeiro e 16 de março, a situação foi mais gravosa para os três parâmetros em estudo relativamente a iguais períodos de 2007 e de 2008. Esta situação poderia ter estado associada à eliminação dos primeiros jatos de leite antes da acoplagem das unidades de ordenha, que começou a ser praticada em 2009 e/ou, como já foi aqui discutido, a IIM por determinados micro-organismos ou estirpes mais virulentas que não predominavam no efetivo no passado. Vários estudos (Schukken et al., 1991; Elbers et al. 1998; Peeler et al., 2000; O'Reilly et al. 2006) demonstraram que a inspeção dos primeiros jatos de leite antes da ordenha foi um fator de risco para mastites clínicas. Esta prática, por um lado, aumenta a capacidade de deteção de casos moderados de mastite clínica, que de outra forma dificilmente seriam diagnosticados, por outro lado, pode favorecer a transmissão de agentes de mastites durante a ordenha, se não for corretamente executada. Dado que o presente trabalho apenas contempla uma exploração e os indicadores referidos acima foram comparados com a realidade britânica, futuros trabalhos deveriam ser desenvolvidos em mais explorações portuguesas, de forma a poder averiguar-se se os valores propostos por Blowey e Edmondson (2010) se enquadram ou não com a realidade nacional.

De uma forma geral, não se observaram diferenças claras em termos de sazonalidade de incidência de mastites clínicas em 2007 e em 2008, independentemente de diferenças de temperatura e de humidade, que possam ter surgido entre os meses mais quentes e mais frios nesses anos. No entanto, vários estudos já demonstraram sazonalidade na incidência geral de mastites clínicas (Hogan et al. 1989b; Waage et al., 1998; Olde Riekerink et al., 2007) e de mastites clínicas por determinados micro-organismos ao longo do ano (Hogan et al., 1989a; Waage et al. 1999; Olde Riekerink et al., 2007). Em contraste com o nosso estudo, esses foram realizados em mais do que uma exploração. Para além disto, as diferenças registadas podem também ser devidas à localização geográfica das explorações e/ou às práticas de manejo. Por exemplo, na nossa exploração as vacas estavam estabuladas durante todo o ano, enquanto em algumas explorações desses estudos as vacas alternavam períodos de estabulação com períodos de pastoreio (Waage et al., 1998; Olde Riekerink et al., 2007).

Vários estudos demonstraram que a incidência de mastites clínicas aumentou com o número de lactações, e os resultados deste estudo também o confirmam, à exceção da transição da 3.^a para a 4.^a lactação. À medida que as vacas vão envelhecendo há um maior risco de infeção e de permanecerem infetadas por mais tempo, porque começam a surgir alterações anatómicas dos tetos, que perturbam o normal funcionamento das barreiras físicas de defesa; a imunidade tende a diminuir; surgem outras afeções que podem predispor diretamente ou indiretamente para mastites, como, por exemplo, a hipocalcémia, as claudicações, etc.; e as mastites

crónicas, mais frequentes em vacas mais velhas, podem perdurar no tempo e, em determinados períodos da vida dos animais, manifestarem-se clinicamente (Goff & Horst, 1997; Mehrzad, Duchateau, Pyörälä & Burvenich, 2002; Kimura, Reinhardt & Goff, 2006; Green, Bradley, Medley & Browne, 2007; Breen et al., 2009; Gundelach et al., 2011; Reinhardt, Lippolis, McCluskey, Goff & Horst, 2011). A diminuição da incidência de mastites clínicas da 3.^a para a 4.^a lactação pôde ter estado associada ao facto de a 3.^a lactação ser aquela que determinava a longevidade dos animais dentro do efetivo. Isto é, com base na performance das vacas (produção, mastites, fertilidade, claudicações, etc.), durante as três primeiras lactações, poderiam ter sido selecionados os animais que continuavam no efetivo e os que eram refugados; ou, tendo em conta as três primeiras lactações, a 3.^a lactação poderia ter sido aquela em que os animais começavam a padecer de um maior número de afeções e/ou de afeções mais graves, que tornavam insustentável a sua manutenção na exploração não só em termos económicos, mas também em termos de bem-estar animal. Por comparação do período entre 1 de janeiro e 16 de março de 2009 com iguais períodos de 2007 e de 2008, constatou-se que houve um agravamento da situação. À semelhança do que já foi aqui referido, esta situação poderia ter sido devido à eliminação dos primeiros jatos de leite antes da ordenha, que começou a ser praticada a partir de 2009, e/ou a IIM por determinados micro-organismos ou estirpes mais virulentas, que não predominavam no efetivo no passado.

A incidência de mastites clínicas foi mais elevada na fase inicial da lactação e, posteriormente, foi diminuindo com o aumento do número de dias pós-parto, o que está de acordo com os resultados de outros estudos (Hogan et al. 1989b; Bradley & Green, 2001; Olde Riekerink, Barkema, Kelton & Scholl, 2008). Um dos períodos mais críticos para a saúde da glândula mamária bovina é o que decorre entre o parto e as duas a três semanas pós-parto. Neste período ocorrem determinadas condições – o *stress* (Lippolis, 2008; Corbett, 2009), o balanço energético negativo (BEN; Suriyasathaporn, Heuer, Noordhuizen-Stassen & Schukken, 2000a; Grinberg, Elazar, Rosenshine & Shpigel, 2008), a hipocalcémia (Goff & Horst, 1997; Kimura et al., 2006), o edema do úbere (Waage, Ødegaard, Lund, Brattgjerd & Røthe, 2001; Compton et al., 2007b), etc. – que podem afetar ou comprometer muitos mecanismos de defesa, que desempenham um importante papel na imunidade da glândula mamária.

Culturas microbiológicas

As amostras de leite foram recolhidas tanto a vacas com mastite subclínica como clínica, pois nem sempre os micro-organismos responsáveis pela elevação da CCS são os mesmos que provocam mastites clínicas (Mason, 2005). Em ambos os tipos de mastite, as amostras de leite foram recolhidas antes dos animais terem sido ordenhados, porque a sensibilidade de detecção de bactérias causadoras de IIM é maior antes do que após a ordenha (Sears, Wilson, González & Hancock, 1991).

Em termos de mastites subclínicas, 46 amostras de leite, de um quarto, de 46 vacas foram recolhidas e processadas. De acordo com alguns autores (Mason, 2005; O'Grady, 2007), quando se investiga um problema de CCS elevadas, num efetivo leiteiro, devem ser enviadas para o laboratório, pelo menos, 10 a 12 amostras de leite, de vacas com elevadas descargas celulares. Esta quantidade de amostras geralmente é suficiente, e permite minimizar a possível presença de amostras contaminadas ou a ausência de crescimento em algumas delas. No entanto, se necessário mais amostras poderão ser reportadas. As amostras de leite de casos de mastite clínica que chegaram ao laboratório foram, de uma forma geral, corretamente identificadas e assepticamente recolhidas devido à presença de alterações macroscópicas do leite (demasiadamente aquoso, alteração da cor, presença de coágulos de fibrina, etc.) e ao baixo número de amostras contaminadas, respetivamente.

A ausência de crescimento verificou-se tanto em amostras de leite de casos de mastite subclínica (4,3 %) como de mastite clínica (25,0 %). Em alguns estudos (Erskine, Eberhart, Hutchinson, Spencer & Campbell, 1988; Bradley, Leach, Breen, Green & Green, 2007b), a proporção de amostras sem crescimento foi similar ao do nosso estudo, e noutros (Makovec & Ruegg, 2003; Bradley et al., 2007b; Olde Riekerink et al., 2008) foi bastante superior, chegando a atingir, por exemplo, os 40 %. O não crescimento de micro-organismos de amostras de leite de vacas com IIM poderia ter estado relacionado com a ausência ou a baixa quantidade de micro-organismos nas amostras de leite recolhidas. Por exemplo, as mastites por coliformes são acompanhadas por uma rápida resposta inflamatória e, por vezes, quando se procede à colheita de amostras de leite a infeção pode já ter sido debelada, ainda que o animal mantenha os sinais clínicos de doença (Waage et al., 1999). Determinados agentes de mastite bovina, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* (Sears et al., 1990) e *Prototheca* spp. (González, 1996; Roesler & Hensel, 2003), são, por vezes, eliminados no leite de forma intermitente, sobretudo de casos de mastite crónica. Para além disto, outras possíveis razões para esta ausência de crescimento poderiam ter sido as condições de crescimento inadequadas (NMC, 1998; NMC, 1999; Mason, 2005; Lam et al., 2009); a morte dos micro-organismos

por mau acondicionamento ou por congelação das amostras de leite entre a colheita e o processamento laboratorial (Schukken, Smit, Grommers, Vandegheer & Brand, 1989a); e a presença de inibidores de crescimento (por exemplo, antibióticos) no leite (Mason, 2005). Por exemplo, *Mycoplasma* spp. tem requisitos nutricionais específicos, não crescendo nos meios de cultura utilizados por rotina para pesquisa de agentes microbianos aeróbios (NMC, 1998; NMC, 1999; Mason, 2005; Lam et al., 2009). No entanto, estas três últimas razões, que poderão ser causas de culturas microbiológicas sem crescimento, teriam sido pouco prováveis no nosso estudo, porque mastites por *Mycoplasma* spp. fazem-se acompanhar por sinais clínicos característicos (NMC, 1999), que não foram observados nas nossas vacas; as amostras foram corretamente acondicionadas, não tendo sido submetidas a congelação; e os colaboradores da exploração foram alertados e sensibilizados para, no caso de mastites clínicas, instituírem o tratamento apenas após a colheita.

Os resultados da microbiologia revelaram, tanto para casos de mastite subclínica como de mastite clínica, o isolamento, sobretudo de micro-organismos de natureza ambiental com um predomínio de *Streptococcus uberis* e SCN, o que foi similar aos resultados de um estudo britânico (Bradley et al., 2007b).

Streptococcus uberis é considerado a principal espécie de *Streptococcus* isolada do úbere bovino (NMC, 1999), e, em alguns países (Compton, Heuer, Parker & McDougall, 2007a), o agente ambiental mais comum de mastite bovina. As IIM por *Streptococcus uberis* ocorrem sobretudo em vacas estabuladas com camas à base de palha (Radostitis et al., 2007; Blowey & Edmondson, 2010), todavia, os animais em pastoreio também se podem infetar, principalmente em pastagens com áreas sombrias, poças e zonas lamacentas (Radostitis et al., 2007). A prevalência de *Streptococcus uberis* em algumas vacarias pode ser bastante elevada, porque algumas vacas permanentemente colonizadas por esta bactéria podem continuamente eliminá-la nas fezes e, assim, contribuir, por exemplo, para a contaminação da palha das camas (Radostitis et al., 2007). Para além disto, ao longo dos últimos anos, e ao contrário do que se verificava no passado, este micro-organismo também tem sido associado a casos de mastite crónica e subclínica; e, embora seja considerado um agente ambiental, há ainda a possibilidade de algumas estirpes puderem ser transmitidas entre quartos do mesmo animal e entre vacas durante a ordenha (Phuektes et al., 2001; Zadoks et al., 2003; Blowey & Edmondson, 2010).

Em muitos países, SCN têm sido dos principais microrganismos isolados de casos de mastite, e de estudos de prevalência de agentes de mastite bovina (Wilson, González & Das, 1997; Sargeant, Scott, Leslie, Ireland & Bashiri, 1998; Makovec & Ruegg, 2003; Pitkälä, Haveri, Pyörälä, Myllys & Honkanen-Buzalski, 2004). Estes micro-organismos, embora possam

causar mastites, fazem também parte da microflora da pele dos tetos e, muitas vezes, são isolados de amostras de leite, porque são arrastados do canal e/ou do orifício do teto (White, Harmon, Matos & Langlois, 1989; Trinidad, Nickerson & Alley, 1990; Matthews et al. 1992). Por estas razões, o isolamento de SCN de casos de mastite subclínica ou de mastite clínica, mesmo em culturas puras, deve ser interpretado com algum cuidado.

Os casos de mastite clínica associados a sinais clínicos mais graves de doença foram provocados, sobretudo por coliformes, o que está de acordo com os resultados de outros estudos (Menzies et al., 2000; Bradley & Green, 2001). *Escherichia coli* é considerada o segundo agente ambiental mais prevalente de mastite bovina (Blowey & Edmondson, 2010). Os coliformes são dos micro-organismos mais frequentemente isolados de explorações com baixas CCSLT (Erskine et al., 1988; Hogan et al. 1989b; Barkema et al., 1998a). A patogénese das IIM por coliformes deve-se ao facto destes micro-organismos, tal como todas as bactérias de Gram negativo, possuírem na membrana externa da sua parede celular um lipopolissacarídeo (LPS ou endotoxina). O LPS quando é libertado da parede celular bacteriana, durante a multiplicação ou a lise das bactérias, induz uma resposta inflamatória localizada e sistémica. A doença clínica ocorre quando são libertadas grandes quantidades de endotoxinas e/ou quando o sistema imunitário do hospedeiro responde de forma demasiadamente exuberante ao estímulo inflamatório (Lehtolainen, Suominen, Kutila & Pyörälä, 2003; Van Amersfoort, Van Berkel & Kuiper, 2003; Blowey & Edmondson, 2010).

Estudo caso-controlo. Relação entre a CCS de casos e de controlos

A média da CCS dos casos foi estatisticamente mais elevada do que a dos controlos para CCS (▲) e CCS (■). Outros estudos (Deluyker et al., 1993; Beaudeau, et al., 1998; Rupp & Boichard, 2000; de Haas et al., 2002; Breen et al., 2009; van den Borne et al., 2011) também já demonstraram que vacas com elevadas CCS estiveram em maior risco ou apresentaram maior número de casos de mastite clínica do que as com baixas CCS. Isto pode suceder porque vacas com elevadas descargas celulares, normalmente padecem de IIM subclínicas persistentes que, em determinados momentos das suas vidas, podem emergir clinicamente. No nosso estudo, os agentes isolados tanto de casos de mastite subclínica como de mastite clínica foram predominantemente os mesmos, *Streptococcus uberis* e SCN, o que vai de encontro a esta associação. No entanto, o período de colheita de amostras de leite não coincidiu totalmente com o período ou com os dados que foram utilizados no estudo caso-controlo, e os primeiros jatos de leite não foram eliminados, entre janeiro de 2007 e janeiro de 2009, o que pode ter contribuído para que muitos casos de mastite clínica possam ter sido

subdiagnosticados. Assim sendo, a relação proferida acima deve ser analisada com algum cuidado.

CAPÍTULO 5 — Conclusão

➤ CCS:

- a CCSLT do efetivo aumentou de 2007 para 2008;
- ao longo do ano de 2007, as proporções mensais de vacas infetadas aumentaram;
- entre janeiro de 2007 e janeiro de 2009, as percentagens mensais de vacas com IIM crónicas aumentaram;
- eficácia da terapêutica de secagem: a situação piorou de 2007 para 2008, isto é, as percentagens de vacas nos grupos «alta/alta» e «baixa/alta» aumentaram.

➤ Mastites clínicas:

- as taxas de mastites e de recorrência foram ligeiramente mais elevadas em 2008 do que em 2007;
- o período entre 1 de janeiro e 16 de março do ano de 2009 foi o que apresentou piores resultados em termos de taxa de mastites, percentagem do efetivo afetado e taxa de recorrência;
- a IMédMC por mês foi igual em 2007 e em 2008;
- em 2007 e em 2008, a IMC por lactação aumentou com o aumento do número de lactações, à exceção da transição da 3.^a para a 4.^a lactação;
- em 2008, a IMC por períodos de lactação de 60 dias foi mais elevada nos primeiros 60 dias e, posteriormente, foi diminuindo com o decorrer da lactação.

➤ Culturas microbiológicas:

- as espécies e/ou os géneros de micro-organismos isolados, tanto de casos de mastite subclínica como de clínica, foram os mesmos. Os agentes etiológicos mais frequentemente isolados de ambos os tipos de mastite foram *Streptococcus uberis* e SCN;
- em amostras de leite provenientes de casos de mastite clínica de grau II isolaram-se sobretudo bactérias de Gram positivo, enquanto nas de grau III foram, predominantemente, bactérias de Gram negativo;

- *Estudo caso-controlo: relação entre a CCS de casos e de controlos:*
- a média da CCS dos casos foi mais elevada do que a dos controlos. No entanto, as diferenças observadas apenas foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para as última e penúltima CCS antes do diagnóstico de mastite clínica.

BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup, F.M. & Jensen, N.E. (1997). Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *Journal of Dairy Science*, 80 (2), 307-312.
- Anderson, K.L. & Walker, R.L. (1988). Sources of *Prototheca* spp. in a dairy environment. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193 (5), 553-556.
- Ball, H.J., Finlay, D., Mackie, D.P., Greer, D., Pollock, D., & McNair, J. (1991). Application of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of an inflammatory response antigen in subclinical mastitic milk samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (8), 1625-1628.
- Barbano, D.M., Rasmussen, R.R. & Lynch, J.M. (1991). Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *Journal of Dairy Science*, 74 (2), 369-388.
- Barbano, D.M., Ma, Y. & Santos, M.V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 89 (E.Suppl.), E15-E19.
- Barkema, H.W., Deluyker, H.A., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., van Goubergen, M. F. G. & de Gee, T.L.W (1997). Somatic cell count in the first six milkings after calving. *Épidémiologie et Santé Animale*, 31-32.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Wilmink, H., Benedictus, G. & Brand, A. (1998a). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 81 (2), 411-419.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Benedictus, G. & Brand, A. (1998b). Management practices associated with low, medium and high somatic cell in bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 81 (7), 1917-1927.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Benedictus, G. & Brand, A. (1999). Physiology and management: management practices associated with incidence rate of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 82(8), 1643-1654.
- Bartlett, P.C., Miller, G.Y., Lance, S.E. & Heider, L.E. (1992). Managerial determinants of intramammary coliform and environmental streptococci infections in Ohio dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 75 (5), 1241-1252.
- Batavani, R.A., Asri, S. & Naebzadeh, H. (2007). The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8(3), 205-211.
- Baxter, J.D., Rogers, G.W., Spencer, S.B. & Eberhart, R.J. (1992). The effect of milking machine liner slip on new intramammary infections. *Journal of Dairy Science* 75 (4), 1015-1018.
- Beaudeau, F., Seegers, H., Fourichon, C. & Hortet, P. (1998). Association between milk somatic cell counts up to 400,000 cells/ml and clinical mastitis in French Holstein cows. *Veterinary Record*, 143 (25), 685-687.

- Beaudeau, F., Fourichon, C., Seegers, H. & Bareille, N. (2002). Risk of clinical mastitis in dairy herds with high proportion of low individual milk somatic-cell counts. *Preventive Veterinary Medicine*, 53, 43-54.
- Berry, E.A. & Hillerton, J.E. (2002a). The effect of an intramammary teat seal on new intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 85 (10), 2512-2520.
- Berry, E.A. & Hillerton, J.E. (2002b). The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 85 (1), 112-121.
- Berry, D.P. & Meaney, W.J. (2005). Cow factors affecting the risk of clinical mastitis. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 44, 147-156.
- Berry, E.A. & Hillerton, J.E. (2007). Effect of an intramammary teat seal and dry cow antibiotic in relation to dry period length on postpartum mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90 (2), 760-765.
- Bexiga, R., Cavaco, L. & Vilela, C.L. (2003). Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98 (545), 33-37.
- Biggs, A. (2005). Getting the most from cell counts. *Cattle Practice*, 13 (2), 177-184.
- Blowey, R. & Edmondson, P. (2010). *Mastitis control in dairy herds*. (2nd ed.). London, United Kingdom: CAB International.
- Boddie, R.L. & Nickerson, S.C. (1997). Evaluation of two iodophor teat germicides: activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Dairy Science*, 80 (8), 1846-1850.
- Boehmer, J.L., Ward, J.L. Peters, R.R., Shefcheck, K.J., McFarland, M.A. & Bannerman, D.D. (2010). Proteomic analysis of the temporal expression of bovine milk proteins during coliform mastitis and label-free relative quantification. *Journal of Dairy Science*, 93 (2), 593-603.
- Bouraoui, R., Lahmar, M. Majdoub, A., Djemali, M. & Belyea, R. (2002). The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Animal Research*, 51 (6), 479-491.
- Bovine Alliance on Management and Nutrition (2008). *Feeding pasteurized milk to dairy calves*. Acedido em Set. 19, 2012, disponível em: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/bamn/BAMN08_FeedPastMilk.pdf.
- Bradley, A.J. & Green, M.J. (2000). Physiology and management: a study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. *Journal of Dairy Science*, 83 (9), 1957-1965.
- Bradley, A.J. & Green, M.J. (2001). Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. *Veterinary Record*, 148 (22), 683-686.
- Bradley, A.J. & Green, M.J. (2005). Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In Practice*, 27 (6), 310-315.

- Bradley, A., Breen, J. e Green, M. (2007a). Mastitis pattern analysis – a fresh look at the analysis of bovine mastitis: part 1 – somatic cell count data. *UK Vet - Livestock*, 12 (7), 29-35.
- Bradley, A.J., Leach, A., Breen, J.E., Green, L.E. & Green, M.J. (2007b). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160 (8), 253-258.
- Bradley, A.J., Breen, J.E., Payne, B., Williams, P. & Green, M.J. (2010). The use of cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination. *Journal of Dairy Science*, 93 (4), 1566-1577.
- Bramley, A.J., Mckinnon, C.H., Staker, R.T. & Simpkin, D.L. (1984). The effect of udder infection on the bacterial flora of the bulk milk of ten dairy herds. *Journal of Applied Microbiology*, 57, 317-323.
- Breen, J.E., Green, M.J. & Bradley A.J. (2009). Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *Journal of Dairy Science*, 92 (6), 2551-2561.
- Briley, M.S. & Eisenthal, R. (1974). Association of xanthine oxidase with the bovine milk-fat-globule membrane: catalytic properties of the free and membrane-bound enzyme. *The Biochemical Journal*, 143, 149-157.
- Brito, M.A.V.P., Brito, J.R.F., de Souza, H.M. & Vargas, O.L. (1998). Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 18 (1), 39-44.
- Burvenich, C., Bannerman, D.D., Lippolis, J.D., Peelman, L., Nonnecke, B.J., Kehrli Jr., M.E. & Paape, M.J. (2007). Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder *Escherichia coli* infections during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 90 (E.Suppl.), E39-E54.
- Butler, J.A., Sickles, S.A., Johanns, C.J. & Rosenbusch, R.F. (2000). Pasteurization of discard *Mycoplasma mastitic* milk used to feed calves: thermal effects on various *Mycoplasma*. *Journal of Dairy Science*, 83 (10), 2285-2288.
- Buzzini, P., Turchetti, B., Facelli, R., Baudino, R., Cavarero, F., Mattalia, L., Mosso, P. & Martini, A. (2004). First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia*, 158 (4), 427-430.
- Capuco, A.V., Bright, S.A., Pankey, J.W., Wood, D.L., Miller, R.H. & Bitman, J.(1992). Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *Journal of Dairy Science*, 75 (8), 2126-2130.
- Carlén, E., Strandberg, E. & Roth, A. (2004). Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 87 (9), 3062-3070.
- Chandan, R.C., Parry Jr., R.M. & Shahani, K.M. (1968). Lysozyme, lipase and ribonuclease in milk of various species. *Journal of Dairy Science*, 51 (4), 606-607.

- Chew, B.P., Hollen, L.L., Hillers, J.K. & Herlugsen, M.L. (1982). Relationship between vitamin A and β -carotene in blood plasma and milk and mastitis in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 65 (11), 2111-2118.
- Chrystal, M.A., Seykora, A.J. & Hansen, L.B. (1999). Genetics and breeding: heritabilities of teat end shape and teat diameter and their relationships with somatic cell score. *Journal of Dairy Science*, 82 (9), 2017-2022.
- Chrystal, M.A., Seykora, A.J., Hansen, L.B., Freeman, A.E., Kelley, D.H. & Healey, M.H. (2001). Heritability of teat-end shape and the relationship of teat-end shape with somatic cell score for an experimental herd of cows. *Journal of Dairy Science*, 84 (11), 2549-2554.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Barchiesi, F. & Scalise, G. (2000). Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 577-582.
- Coffey, E.M., Vinson, W.E. & Pearson, R.E. (1986). Somatic cell counts and infection rates for cows of varying somatic cell count in initial test of first lactation. *Journal of Dairy Science*, 69 (2), 552-555.
- Collins, R.A., Werling, D., Duggan, S.E., Bland, A. P., Parsons, K.R. & Howard, C.J. (1998). $\gamma\delta$ T cells present antigen to $CD4^+$ $\alpha\beta$ T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 63 (6), 707-714.
- Commission Directive 89/362/EEC of 26 May. *General conditions of hygiene in milk production holdings*. Acedido em Out. 14, 2011, disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1989:156:0030:0032:EN:PDF>.
- Compton, C.W.R., Heuer, C., Parker, K. & McDougall, S. (2007a). Epidemiology of mastitis in pasture-grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity. *Journal of Dairy Science*, 90 (9), 4157-4170.
- Compton, C.W.R., Heuer, C., Parker, K. & McDougall, S. (2007b). Risk factors for peripartum mastitis in pasture-grazed dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 90 (9), 4171-4180.
- Cope, C.M., Mackenzie, A.M., Wilde, D. & Sinclair, L.A. (2009). Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. *Journal of Dairy Science*, 92 (5), 2128-2135.
- Corbett, R. (2009). Minimizing the effects of immunosuppression through management and nutrition. In National Mastitis Council, *Proceedings of the NMC Annual Meeting*, pp. 113-119. Acedido em Dez. 26, 2009, disponível em: <http://nmconline.org/articles/ImmSupp.pdf>.
- Council Directive 92/46/EEC of 16 June. *Laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products*. Acedido em Dez. 16, 2009, disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31992L0046:EN:HTML>.

- Dahl, G.E., Wallace, R.L., Shanks, R.D. & Lueking, D. (2004). Hot topic : effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health. *Journal of Dairy Science*, 87 (4), 882-885.
- de Haas, Y., Barkema, H.W. & Veerkamp, R.F. (2002). The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 85 (5), 1314-1323.
- Deluyker, H.A., Gay, J.M. & Weaver, L.D. (1993). Interrelationships of somatic cell count, mastitis and milk yield in a low somatic cell count herd. *Journal of Dairy Science*, 76 (11), 3445-3452.
- Deluyker, H.A., Oye, N.V. & Boucher, J.F. (2005). Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 88 (2), 604-614.
- Detilleux, J., Vangroenweghe, F. & Burvenich, C. (2006). Mathematical model of the acute inflammatory response to *Escherichia coli* in intramammary challenge. *Journal of Dairy Science*, 89 (9), 3455-3465.
- Dingwell, R.T., Leslie, K.E., Schukken, Y.H., Sargeant, J.M. & Timms, L.L. (2003). Evaluation of the California mastitis test to detect intrammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Canadian Veterinary Journal*, 44, 413-416.
- Dinsmore, R.P., English, P.B., González, R.N., Sears, P.M. & Schulte, H.F. (1991) Physiology and management: evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 74 (5), 1521-1526.
- Dion, W.M. (1982). Bovine mastitis due to *Prototheca zopfi* II. *Canadian Veterinary Journal*, 23, 272-275.
- Dionysius, D.A., Grieve, P.A. & Milne, J.M. (1993). Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*, 76 (9), 2597-2606.
- Djarbi, B., Bareille, N., Beaudeau, F. & Seegers, H. (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Veterinary Research*, 33, 335-357.
- Doherty, M. & O'Grady, L. (2009). Focus on bovine mastitis: knowledge into practice. *Irish Veterinary Journal*, 62 (Supl.), 4.
- Dohoo, I.R. & Meek, A.H. (1982). Somatic cell counts in bovine milk. *Canadian Veterinary Journal*, 23, 119-125.
- Dohoo, I. (2001). Setting SCC cutpoints for cow and herd interpretation. In National Mastitis Council, *Proceedings of the 40th National Mastitis Council Annual Meeting, Reno, USA, 11-14 February*, pp.10-18. Acedido em Dez. 19, 2009, disponível em: <http://www.milkproduction.com/NR/rdonlyres/FAD8E2EC-121E-447A-80AB-6E9BE1BC9505/0/dohooSettingSCCupoints.pdf>.

- Döpfer, D., Barkema, H.W., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H. & Gaastra, W. (1999). Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 82 (1), 80-85.
- Driessen, J. (2009). Vacas satisfeitas, produtores satisfeitos, “proprietarite” e “consultorite”.... *Revista Portuguesa de Buiatria*, 13 (14), 38-42.
- Edmondson, P. (2001). Influence of milking machines on mastitis. *In Practice*, 23 (3), 150-159.
- Elbers, A.R.W., Miltenburg, J.D., De Lange, D., Crauwels, A.P.P., Barkema, H.W. & Schukken, Y.H. (1998). Risk factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the southern part of the Netherlands. *Journal of Dairy Science*, 81 (2), 420-426.
- Ellison, R.T., LaForce, F.M., Giehl, T. J., Boose, D.S. & Dunn, B.E. (1990). Lactoferrin and transferrin damage of the Gram-negative outer membrane is modulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Journal of General Microbiology*, 136, 1437-1446.
- Erskine, R.J., Eberhart, R.J., Hutchinson, L.J., Spencer, S.B. & Campbell, M.A. (1988). Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192 (6), 761-765.
- Erskine, R.J. (1995). Coliform mastitis therapy. In National Mastitis Council, *Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting, Harrisburg, Pennsylvania, USA*, p. 72. Acedido em Mar. 15, 2010, disponível em: <http://www.nmconline.org/articles/coliformthrp.htm>.
- Filippsen, L.F., Moreira, F.B., Sakashita, A.T. & Bittencourt, D.R. (1999). Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. *Ciência Rural*, 29 (1), 87-89.
- Fitzpatrick, J., Young, F.J., Eckersall, D., Logue, D.N., Knight, C.J. & Nolan, A. (1998). Recognizing and controlling pain and inflammation in mastitis. In Axient/ Institute for Animal Health, Milk Development Council/Novartis Animal Health. *Proceedings of the British Mastitis Conference*, pp. 36-44. Acedido em Set. 22, 2011, disponível em: <http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC1998papers/Fitzpatrick.pdf>.
- Fernandes, A.M., Oliveira, C.A.F. & Lima C.G. (2007). Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. *International Dairy Journal* 17, 111-115.
- Fleming, A. (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 93 (653), 306-317.
- Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K. & Odumeru, J. (2002). Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Journal of Dairy Science*, 85 (12), 3198-3205.

- Garcia-Peñarrubia, P., Koster, F.T., Kelley, R. O., McDowell, T.D. & Bankhurs, A.D. (1989). Antibacterial activity of human natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*, 169 (1), 99-113.
- George, L.W., Divers, T.J., Ducharme, N. & Welcome, F.L. (2008). Diseases of the teats and udder. In T.J Divers & S.F. Peek, *Rebhun`s: diseases of dairy cattle*. (2nd edition). (pp. 358-394). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Godden, S., Rapnicki, P., Stewart, S., Fetrow, J., Johnson, A., Bey, R. & Farnsworth, R. (2003). Effectiveness of an internal teat seal in the prevention of new intramammary infections during the dry and early lactation periods in dairy cows when used with a dry cow intramammary antibiotic. *Journal of Dairy Science*, 86 (12), 3899-3911.
- Godkin, M.A. & Leslie, K.E. (1993). Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. *Canadian Veterinary Journal*, 34, 601-605.
- Goff, J.P. & Horst, R.L. (1997). Physiology and management: physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, 80 (7), 1260-1268.
- González, R.N., Jasper, D.E., Kronlund, N.C., Farver, T.B., Cullor, J.S., Bushnell, R.B. & Dellinger, J.D. (1990). Clinical mastitis in two California dairy herds participating in contagious mastitis control programs. *Journal of Dairy Science*, 73 (3), 648 – 660.
- González, R.N. (1996). Prototheca, Yeast, and Bacillus as a cause of mastitis. In National Mastitis Council, *Proccedings of the National Mastitis Council Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA*, p. 82. Acedido em Abr. 10, 2010, disponível em: <http://www.nmconline.org/articles/prototheca.htm>.
- Green, M.J., Bradley, A.J., Medley, G.F. & Browne, W.J. (2007). Cow, farm and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving. *Journal of Dairy Science*, 90 (8), 3764-3776.
- Grinberg, N., Elazar, S., Rosenshine, I. & Shpigel, N.Y. (2008). β - hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 76 (6), 2802-2807.
- Guidry, A.J. & Miller, R.H. (1986). Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. *Journal of Dairy Science*, 69 (7), 1799-1805.
- Hamann, J. (2001). Changes in milk somatic cell count with regard to the milking process and the milking frequency – preliminary report. *Mastitis Newsletter of the International Dairy Federation*, 24, 5-6.
- Hancock, J.T., Salisbury, V., Ovejero-Boglione, M.C., Cherry, R., Hoare, C., Eisenthal, R. & Harrison, R. (2002). Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (10), 3308-3310.
- Harada, T., Baba, M. & Morikawa, S. (1973). Immunohistochemical localization of lactoperoxidase in bovine tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 21 (9), 804-811.

- Harmon, R.J. (1994). Symposium: mastitis and genetic evaluation for somatic cell count: physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77 (7), 2103-2112.
- Hassan, K.J., Samarasinghe, S., & Lopez-Benavides, M.G. (2009). Use of neural networks to detect minor and major pathogens that cause bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1493-1499.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslöf, A. & Pyörälä, S. (2008). Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (11), 3728-3735.
- Hayes, M.C., Raleya, R.D., Murphy, S.C., Carey, N.R., Scarlett, J.M. & Boor, K.J. (2001). Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. *Journal of Dairy Science*, 84 (1), 292-298.
- Hensen, S.M., Pavičić, M.J.A.M.P, Lohuis, J.A.C.M & Poutrel, B. (2000). Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Dairy Science*, 83 (3), 418-429.
- Heyneman, R., Burvenich, C. & Vercauteren, R. (1990). Interaction between respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *Journal of Dairy Science*, 73 (4), 985-994.
- Hillerton, J.E. & Kliem, K.E. (2002). Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *Journal of Dairy Science*, 85 (4), 1009-1014.
- Hillerton, J.E. & Berry, E.A. (2004). Quality of milk supply: European regulations versus practice. In National Mastitis Council, *Proceedings of the NMC Annual Meeting*, pp. 207-214. Acedido em Dez. 10, 2009, disponível em: <http://www.nmconline.org/articles/qualityeuro.pdf>.
- Hillerton, J.E. & Berry, E.A. (2005). Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1250-1255.
- Hogan, J.S., Pankey, J.W. & Duthie, A.H. (1987). Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 70 (5), 927-934.
- Hogan, J.S. Smith, K.L., Hoblet, K.H., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L. & Conrad, H.R. (1989a). Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *Journal of Dairy Science*, 72 (1), 250-258.
- Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H., Schoenberger, P.S., Todhunter, D.A., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L. & Conrad, H.R. (1989b). Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *Journal of Dairy Science*, 72 (6), 1547-1556

- Hogan, J.S., Todhunter, D.A., Smith, K.L. & Schoenberger, P.S. (1989c). Serum susceptibility of coliforms isolated from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 72 (7), 1893-1899.
- Hogan, J.S. & Smith, K.L. (1997). Bacteria counts in sawdust bedding. *Journal of Dairy Science*, 80 (8), 1600-1605.
- Hogan, J.S., Bogacz, V.L., Thompson, L.M., Romig, S., Schoenberger, P.S., Weiss, W.P. & Smith, K.L. (1999). Bacterial counts associated with sawdust and recycled manure bedding treated with commercial conditioners. *Journal of Dairy Science*, 82 (8), 1690-1695.
- Hogan, J.S., Wolf, S.L. & Petersson-Wolfe, C.S. (2007). Bacterial counts in organic materials used as free-stall bedding following treatment with a commercial conditioner. *Journal of Dairy Science*, 90 (2), 1058-1062.
- Hogeveen, H., Miltenburg, J.D., den Hollander, S. & Frankena, K. (2001). Milking three times a day and its effect on udder health and production. *Mastitis Newsletter of the International Dairy Federation*, 24, 7.
- Hughes, J. (2000). Cows and cubicles. *In Practice*, 22 (5), 231-239.
- Hughes, J. (2001). A system for assessing cow cleanliness. *In Practice*, 23 (9), 517-524.
- Huijps, K., Lam, T.J.G.M. & Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, 75, 113-120.
- Hurley, W.L., Grieve, R.C.J., Magura, C.E., Hegarty, H.M. & Zou, S. (1993). Electrophoretic comparisons of lactoferrin from bovine mammary secretions, milk neutrophils and human milk. *Journal of Dairy Science*, 76 (2), 377-387.
- Huxley, J.N., Green, M.J., Green, L.E. & Bradley, A.J. (2002). Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. *Journal of Dairy Science*, 85 (3), 551-561.
- Huzzey, J.M., Veira, D.M., Weary, D.M. & Keyserlingk, M.A.G. (2007). Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *Journal of Dairy Science*, 90 (7), 3220-3233.
- Iigo, M., Kuhara, T., Ushida, Y., Sekine, K., Moore, M.A. & Tsuda, H. (1999). Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clinical & Experimental Metastasis*, 17, 35-40.
- Instituto Nacional de Estatística (2009). *Anual – INE, estatísticas da produção animal: produção de leite (t) por tipo de leite*. Acedido em Jan. 20, 2010, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=000918&contexto=bd&selTab=tab2.
- Jánosi, S., Szigeti, G., Rátz, F., Laukó, T., Kerényi, J., Tenk, M., Katona, F., Huszenica, A., Kulcsár, M. & Huszenica, G. (2001). Epidemiology: *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *Veterinary Quarterly*, 23 (2), 80-83.

- Jayarao, B.M., Pillai, S.R., Sawant, A.A., Wolfgang, D.R. & Hedge, N.V. (2004). Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *Journal of Dairy Science*, 87 (10), 3561-3573.
- Jetten, A.M. & Vogels, G.D. (1972). Mode of action of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2 (6), 456-463.
- Jones, T. & Ohnstad, I. (2002). Milking procedures recommended for the control of bovine mastitis. *Veterinary Record*, 24 (9), 502-511.
- Kalmus, P., Aasmäe, B., Kärssin, A., Orro, T. & Kask, K. (2011). Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 4.
- Kehrli Jr., M.E. & Shuster, D.E. (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine. *Journal of Dairy Science*, 77 (2), 619-627.
- Kenny, K., Bastida-Corcvera, F. & Norcross, N.L. (1992). The enhancement of bovine mammary gland immunity through vaccination. In A.H. Andrews, W. Blowey, H. Boyd & R.G. Eddy, *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*. (pp. 335-350). Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Kesler, E.M. (1981). Feeding mastitic milk to calves: review. *Journal of Dairy Science*, 64 (5), 719-723.
- Kimura, K., Reinhardt, T.A. & Goff, J.P. (2006). Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89 (7), 2588-2595.
- Komine, K., Komine, Y., Kuroishi, T., Kobayashi, J., Obara, Y. & Kumagai, K. (2005). Small molecule lactoferrin with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67 (7), 667-677.
- Kossaibati, M.A. & Esslemont, R.J. (1997). The costs of production diseases in dairy herds in England. *The Veterinary Journal*, 154, 41-51.
- Kováč, G., Popelková, M., Tkáčiková, Ľ., Burdová, O. & Ihnát, O. (2007). Interrelationship between somatic cell count and acute phase proteins in serum and milk of dairy cows. *Acta Veterinaria Brno*, 76 (1), 51-57.
- Lam, T.J., Schukken, Y.H., van Vliet, J.H., Grommers, F.J., Tielen, M.J. & Brand, A. (1997). Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland [abstract]. *American Journal of Veterinary Research*, 58 (1), 17-22. Acedido em Set. 27, 2010, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8989490>.
- Lam, T.J.G.M., Olde Riekerink, R.G.M., Sampimon, O.C. & Smith, H. (2009). Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Irish Veterinary Journal*, 62 (Supl.), 34-39.

- Langford, F.M., Weary, D.M. & Fisher, L. (2003). Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: a dose response to the level of antibiotics fed in milk. *Journal of Dairy Science*, 86 (12), 3963-3966.
- Lee, C.S., Meeusen, E. & Brandon, M.R. (1989). Subpopulations of lymphocytes in the mammary gland of sheep. *Immunology*, 66, 388-393.
- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Sun, Y., Huang, P.L., Kung, H.F., Blithe, D.L. & Chien, H.C. (1999). Lysozyme and RNases as anti-HIV components in β -core preparations of humana chorionic gonadotropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (6), 2678-2681.
- Lehtolainen, T., Suominen, S., Kutila, T. & Pyörälä, S. (2003). Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86 (7), 2327-2333.
- León-Sicairos, N., López-Soto, F., Reyes-López, M., Godínez-Vargas, D., Ordaz-Pichardo, C. & de la Garza, M. (2006). Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, sIgA and lysozyme. *Clinical Medicine and Research*, 4 (2), 106-113.
- Levay, P.F. & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80, 252-267.
- Lévesque, P. (2004). *Less mastitis, better milk*. Québec, Canada: Institut de technologie agroalimentaire.
- Lippolis, J.D. (2008). Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *Journal of Animal Science*, 86 (E. Suppl.), E53-E63.
- Lohuis, J.A.C.M., Schukken, Y.H., Verheijden, J.H.M., Brand, A. & Van Miert, A.S.J.P.A.M. (1990). Effect of severity of systemic signs during the acute phase of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis on milk production losses. *Journal of Dairy Science*, 73 (2), 333-341.
- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D.M., Galton, D.M., Rudan, M.A. & Boor, K.J. (2000). Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 83 (2), 264-274.
- Makovec, J.A. & Ruegg, P.L. (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86 (11), 3466-3472.
- Malinowski, E., Lassa, H. & Klossowska, A. (2002). Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udders. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 46, 295-299.
- Mallard, B.A., Dekkers, J.C., Ireland, M.J., Leslie, K.E., Sharif, S. Vankampen, C.L., Wagter, L. & Wilkie, B.N. (1998). Symposium in bovine immunology: alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *Journal of Dairy Science*, 81 (2), 585-595.

- Mangino, M.E. & Brunner, J.R. (1977). Isolation and partial characterization of xanthine oxidase associated with the milk fat globule membrane of cows' milk. *Journal of Dairy Science*, 60 (6), 841-850.
- Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J. & Thompson, G. (2006). Short communication: in vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89 (11), 4202-4204.
- Marques, S., Silva, E., Kraft, C., Carvalheira, J., Videira, A., Huss, V.A.R. & Thompson, G. (2008). Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (6), 1941-1945.
- Marr, A.K., Jenssen, M.R., Moniri, M.R., Hancock, R.E.W. & Panté, N. (2009). Bovine lactoferrin and lactoferricin interfere with intracellular trafficking of herpes simplex virus-1. *Biochimie*, 91, 160-164.
- Marsh, J.E., Zhou, W. & Sacks S.H. (2001). Review: Local tissue complement synthesis — fine tuning a blunt instrument. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 49, Suppl.1, S41-S46.
- Mason, C.S. (2005). Basic mastitis bacteriology – untangling the pathogens. *Cattle Practice*, 13 (2), 171-175.
- Matias, O. & Martins, P. (2005). *Biologia 12*. Porto: Areal Editores.
- Matos, J.S., White, D.G., Harmon, R.J. & Langlois, B.E. (1991). Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 74 (5), 1544-1549.
- Matthews, K.R., Harmon, R.J. & Smith, B.A. (1990). Protective effect of *Staphylococcus chromogenes* infection against *Staphylococcus aureus* infection in the lactating bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 73 (12), 3457-3462.
- Matthews, K.R., Harmon, R.J. & Langlois, B.E. (1991). Effect of naturally occurring coagulase-negative Staphylococci infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine. (1991). *Journal of Dairy Science*, 74 (6), 1855-1859.
- Matthews, K.R., Harmon, R.J. & Langlois, B.E. (1992). Prevalence of *Staphylococcus* species during periparturient period in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, 75 (7), 1835-1839.
- Mazal, G., Vianna, P.C.B., Santos, M.V. & Gigante, M.L. (2007). Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. *Journal of Dairy Science*, 90 (2), 630-636.
- McDermott, M.P., Erb, H.N., Natzke, R.P., Barnes, F.D. & Bray, D. (1983). Cost benefit analysis of lactation therapy with somatic cell counts as indicators for treatment. *Journal of Dairy Science*, 66 (5), 1198-1203.
- Meek, A.H., Martin, S.W., Stone, J.B., McMillan, I., Britney, J.B. & Grieve, D.G. (1986). The relationship among current management systems, production, disease and drug usage on Ontario dairy farms. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50, 7-14.

- Mehrzaad, J., Duchateau, L., Pyörälä, S. & Burvenich, C. (2002). Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 85 (12), 3268-3276.
- Melville, P.A., Watanabe, E.T., Benites, N.R., Ribeiro, A.R., Silva, J.A.B., Garino Jr., F. & Costa, E.O. (1999). Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia*, 146, 79-82.
- Menzies, F.D., McBride, S.H., McDowell, S.W.J., McCoy, M.A., McConnell, W. & Bell, C. (2000). Clinical and laboratory findings in cases of toxic mastitis in cows in Northern Ireland. *The Veterinary Record*, 147 (5), 123-128.
- Mickelson, M.N. (1966). Effect of lactoperoxidase and thiocyanate on the growth of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined culture medium. *Journal of General Microbiology*, 43, 31-48.
- Milner, P., Page, K.L., Walton, A.W. & Hilleron, J.E. (1996). Detection of clinical mastitis by changes in electrical conductivity of foremilk before visible changes in milk. *Journal of Dairy Science*, 79 (1), 83-86.
- Miltenburg, J.D., de Lange, D. Crauwels, A.P.P., Bongers, J. H., Tielen, M J. M., Schukken, Y.H. & Elbers, A.R.W. (1996). Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Veterinary Record*, 139 (9), 204-207.
- More, S.J. (2009). Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry. *Irish Veterinary Journal*, 62 (Suppl.), 5-14.
- Mueller, R., Carroll, E.J. & Panico, L. (1983). Hemolytic complement titers and complement C3 levels in endotoxin-induced mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, 44 (8), 1442-1445.
- Munksgaard, L. Passilé, A.M., Rushen, J., Thodberg, K. & Jensen, M.B. (1997). Discrimination of people by dairy cows based on handling. *Journal of Dairy Science*, 80 (6), 1106-1112.
- Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T., Virtanen, H., Pyörälä, S. & Müller, H.P. (1994). Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine Staphylococcal mastitis. *Journal of Dairy Science*, 77 (2), 446-452.
- Narita, M., Muder, R.R., Cacciarelli, T.V. & Singh, N. (2008). Protothecosis after liver transplantation. *Liver Transplantation*, 14, 1211-1215.
- National Mastitis Council (1998). *Current concepts of bovine mastitis*. (4th edition). Madison, USA: NMC.
- National Mastitis Council (1999). *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Madison, USA: NMC.
- National Mastitis Council (2001). *Guidelines on normal and abnormal raw milk based on somatic cell counts and signs of clinical mastitis*. Acedido em Fev. 9, 2010, disponível em: <http://www.nmconline.org/docs/abnmilk.pdf>.

- National Mastitis Council (n. d. 1). *A practical look to contagious mastitis*. Acedido em Dez. 10, 2009, disponível em: <http://www.nmconline.org/contmast.htm>.
- National Mastitis Council (n. d. 2). *A practical look to environmental mastitis*. Acedido em Dez. 10, 2009, disponível em: <http://www.nmconline.org/environmental.htm>.
- National Mastitis Council (n. d. 3). *Glossary of terms*. Acedido em Mai. 11, 2011, disponível em: <http://www.nmconline.org/glossary.htm>.
- National Mastitis Council (n. d. 4). *Recommend milking procedures*. Acedido em Dez. 10, 2009, disponível em: <http://www.nmconline.org/milkprd.htm>.
- Natzke, R.P., Everett, R.W. & Bray, D.R. (1982). Effects of overmilking on udder health. *Journal of Dairy Science*, 65 (1), 117-125.
- NCBI Taxonomy (2014). Acedido em Nov. 22, 2014, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=Staphylococcus>
- Neijenhuis, F., Barkema, H.W., Hogeveen, H. & Noordhuizen, J.P.T.M. (2000). Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83 (12), 2795-2804.
- Neijenhuis, F., Barkema, H.W., Hogeveen, H. & Noordhuizen, J.P.T.M. (2001). Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84 (12), 2664-2672.
- Nunes, A.F. (2004). *Leite: mecanismos de produção*. Porto, Portugal: Fenalac.
- O'Grady, L. (2007). The high SCC herd – a guide to mastitis investigation. *Irish Veterinary Journal*, 60 (4), 248-251.
- Ohnstad, I. (2005). Clinical forum: parlour hygiene and management. *UK Vet – Livestock*, 10 (7), 33-38.
- Ohnstad, I. (2006). Clinical forum: assessment of milking systems. *UK Vet – Livestock*, 11 (1), 28-32.
- Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W. & Stryhn, H. (2007). The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90 (4), 1704-1715.
- Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Kelton, D.F. & Scholl, D.T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91 (4), 1366-1377.
- Oliveira, C.A.F., Fernandes, A.M., Cunha, O.C.C., Fonseca, L.F.L., Silva, E.O.T. & Balian, S.C. (2002). Composition and sensory evaluation of whole yogurt produced from milk with different somatic cell counts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (3), 192-196.
- Oliver, S.P. & Mitchell, B.A. (1983). Intramammary infections in primigravid heifers near parturition. *Journal of Dairy Science*, 66 (5), 1180-1183.

- Oliver, S.P. & Sordillo, L.M. (1988). Udder health in the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 71 (9), 2584-2606.
- Oliver, S.P., King, S.H., Lewis, M.J., Torre, P.M., Matthews, K.R. & Dowlen, H.H. (1990). Efficacy of chlorhexidine as a postmilking teat disinfectant for the prevention of bovine mastitis during lactation. *Journal of Dairy Science*, 73 (8), 2230-2235.
- Oltenacu, P.A. & Broom, D.M. (2010). The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare* 19 (S), 39-49.
- O'Reilly, K.M., Green, M.J., Peeler, E.J., Fitzpatrick, J.L. & Green, L.E. (2006). Investigation of risk factors for clinical mastitis in British dairy herds with bulk milk somatic cell counts less than 150,000 cells/ml. *Veterinary Record*, 158 (19), 649-653.
- O'Rourke, D. (2009). Nutrition and udder health in dairy cows: a review. *Irish Veterinary Journal*, 62 (Suppl.), 15-20.
- Ouweltjes, W., Beerda, B., Windig, J. J., Calus, M. P. L. & Veerkamp, R. F. (2007). Effects of management and genetics on udder health and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90 (1), 229- 238.
- Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X. & Lee, J.W. (2003). The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*, 34, 597-627.
- Pankey, J.S., Nickerson, S.C., Boddie, R.L. & Hogan, J.S. (1985). Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 68 (10), 2684 – 2693.
- Park, Y.H., Fox, L.K., Hamilton, M.J. & Davis, W.C. (1992). Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *Journal of Dairy Science*, 75 (4), 998-1006.
- Park, Y.K., Koo, H.C., Kim, S.H., Hwang, S.Y., Jung , W.K., Kim, J.M., Shin, S., Kim, R.T. & Park, Y.H. (2007). The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. *Journal of Dairy Science*, 90 (12), 5405-5414.
- Paulrud, C.O., Clausen, S., Andersen, P.E. & Rasmussen, M.D. (2005). Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46 (3), 137-147.
- Peeler, E.J., Green, M.J., Fitzpatrick, J.L., Morgan, K.L. & Green, L.E. (2000). Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 83 (11), 2464-2472.
- Phuektes, P., Mansell, P.D., Dyson, R.S., Hooper, N.D., Dick, J.S. & Browning, G.F. (2001). Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (4), 1460-1466.
- Piessens, V., Van Coillie, E., Verbist, B., Supré, K., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., Heyndrickx, M. & De Vliegher, S. (2011). Distribution of coagulase-negative

- Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*, 94 (6), 2933-2944.
- Pinho, L., Thompson, G. & Carnevali, J. (2010). *Mycoplasma bovis*: abordagem nas explorações leiteiras. *Revista Portuguesa de Buiatria*, 14 (15), 22-34.
- Pitkälä, A., Haveri M., Pyörälä, S., Myllys, V. & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 — prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 87 (8), 2433-2441.
- Politis, I. & Ng-Kwai-Hang, K.F. (1988) Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. *Journal of Dairy Science*, 71 (7), 1720-1727.
- Pore, R.S., Barnett, E.A., Barnes Jr., W.C & Walker, J.D. (1983). *Prototheca* ecology. *Mycopathologia*, 81,49-62.
- Poutrel, B. & Rainard, P. (1981). California mastitis test guide to selective dry cow therapy. *Journal of Dairy Science*, 64 (2), 241-248.
- Pyörälä, S. & Pyörälä, E. (1997). Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 80 (11), 2820-2825.
- Pyörälä, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis: review article. *Journal of Veterinary Research*, 34, 565-578.
- Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal*, 62 (Suppl.), 40-44.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. & Carter, G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing.
- Radostitis, O.M., Gay, C. C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D. (2007). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th edition). Philadelphia, USA: Saunders Elsevier.
- Rainard, P., Poutrel, B. & Caffin, J.P. (1982). Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological aspects. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 13 (4), 321-328.
- Rainard, P. & Poutrel, B. (1988). Effect of naturally occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 49 (3), 327-329.
- Rainard, P. & Poutrel, B. (1995). Deposition of complement components on *Streptococcus agalactiae* in bovine milk in the absence of inflammation. *Infection and Immunity*, 63 (9), 3422-3427.
- Rainard, P. (2002). Bovine milk fat globules do not inhibit C5a chemotactic activity. *Veterinary Research*, 33, 413-419.

- Rainard, P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research*, 34, 647-670.
- Rainard, P. & Riollot, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 37, 369-400.
- Raymond, M.J., Wohrle, R.D. & Call, D.R. (2006). Assessment and promotion of judicious antibiotic use on dairy farms in Washington State. *Journal of Dairy Science*, 89 (8), 3228-3240.
- Rosenberg, G., Gerrit, D. & Roy, M. (1979). *Clinical Examination of Cattle*. Berlin, Germany: Verlag Paul Parey.
- Reinhardt, T. A., Lippolis, J.D., McCluskey, B.J., Goff, J.P. & Horst, R.L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal*, 188, 122-124.
- Ricchi, M., Goretti, M., Branda, E., Cammi, G., Garbarino, C.A., Turchetti, B., Moroni, P., Arrigoni, N. & Buzzini, P. (2010). Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 93 (10), 4625-4631.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M. & Besser, T.E. (1998). Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *Journal of Dairy Science*, 81 (3), 687-693.
- Roesler, U. & Hensel, A. (2003). Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii* – specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (3), 1181-1186.
- Roesler, U., Möller, A., Hensel, A., Baumann, D. & Truyen, U. (2006). Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 (Pt 6), 1419-1425.
- Rogers, G.W., Banos, G., Nielsen, U.S. & Philipsson, J. (1998). Genetic correlations among somatic cell scores, productive life, and type traits from the United States and udder health measures from Denmark and Sweden. *Journal of Dairy Science*, 81 (5), 1445-1453.
- Ruegg, P. & Reinemann, D. (2002). Milk quality and mastitis tests. *The Bovine Practitioner*, 36 (1), 41-54.
- Ruegg, P.L. (2004). When to forestrip: before or after teat disinfection?. In National Mastitis Council. *Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting*, pp. 34. Acedido em Dez. 23, 2010, disponível em: <http://www.nmconline.org/articles/forestrip.htm>.
- Rupp, R. & Boichard, D. (2000). Relationship of early first lactation somatic cell count with risk of subsequent first clinical mastitis. *Livestock Production Science*, 62, 169-180.
- Rushen, J., De Passilé, A.M.B., Munksgaard, I. (1999). Fear of people by cows and effects on milk yield behavior, and heart rate at milking. *Journal of Dairy Science*, 82 (4), 720-727.

- Sakthivel, M., Karthikeyan, N. & Palani, P. (2010). Detection and analysis of lysozyme activity in some tuberous plants and *Calotropis porcera*'s latex. *Journal of Phytology*, 2 (11), 65-72.
- Sandgren, C.H., Waller, K.P. & Emanuelson, U. (2007). *Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. The Veterinary Journal*. Acedido em Set. 27, 2011, disponível em: <http://www.ufsm.br/embryolab/Mast%201%20Therapeutic%20effects%20of%20systemic%20or%20intramammary%20antimicrobial%20treatment%20of%20bovine%20subclinical%20mast.pdf>.
- Sanchez, L., Lujan, L., Oria, R., Castillo, H., Perez, D., Ena, J.M. & Calvo, M. (1992). Nutrition, feeding, and calves: synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep. *Journal of Dairy Science*, 75 (5), 1257-1262.
- Santos, M.V., Ma, Y. & Barbano, D.M. (2003). Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *Journal of Dairy Science*, 86 (8), 2491-2503.
- Sargeant, J.M., Scott, H.M., Leslie, K.E., Ireland, M.J. & Bashiri, A. (1998). Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. *Canadian Veterinary Journal*, 39, 33-38.
- Sargeant, J.M., Leslie, K.E., Shirley, J.E., Pulkrabek, B.J & Lim, G.H. (2001). Sensivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 84 (9), 2018-2024.
- Sarikaya, H., Schlamberger, G., Meyer, H.H.D. & Bruckmaier, R.M. (2006). Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89 (7), 2479-2486.
- Scaccabarozzi, L., Turchetti, B., Buzzini, P., Pisoni, G., Bertocchi, L., Arrigoni, N., Boettcher, P., Bronzo, V. & Moroni, P. (2008). Short communication: isolation of *Prototheca* species strains from environmental sources in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 91 (9), 3474-3477.
- Scaletti, R.W. Trammell, D.S., Smith, B.A. & Harmon, R.J. (2003). Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86 (4), 1240-1249.
- Scaletti, R.W. & Harmon, R.J. (2012). Effect of dietary copper source on response to coliform mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95 (2), 654-662.
- Schepers, A. J., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B.M. & Hanekamp, W.J.A. (1997). Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *Journal of Dairy Science*, 80 (8), 1833-1840.
- Schreiner, D.A. & Ruegg, P.L. (2003). Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86 (11), 3460-3465.

- Schukken, Y.H., Smit, J.A.H., Grommers, F.J., Vandegeer, D. & Brand, A. (1989a). Effects of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *Journal of Dairy Science*, 72 (7), 1900-1906.
- Schukken, Y.H., Van de Geer, D., Grommers, F.J., Smit, J.A.H. & Brand, A. (1989b). Intramammary infections and risk factors for clinical mastitis in herds with low somatic cell counts in bulk milk. *Veterinary Record*, 125 (15), 393-396.
- Schukken, Y.H., Grommers, F.J., Van De Geer, D., Erb, H.N. & Brand, A. (1991). Risk factors for clinical mastitis in herds with low bulk milk somatic cell count: 2. risk factors for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*, 74 (3), 826-832.
- Schukken, Y.H., Leslie, K.E., Weersink, A.J. & Martin, S.W. (1992). Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: 1. Impact on somatic cell counts and milk quality. *Journal of Dairy Science*, 75 (12), 3352-3358.
- Schukken, Y.H., Leslie, K. E., Barnum, D.A., Mallard, B.A., Lumsden, J.H., Dick, P.C., Vessie, G.H. & Kehrli, M.E. (1999). Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *Journal of Dairy Science*, 82 (11), 2393-2401.
- Schukken, Y.H., Bennet, G., Green, L. & van Werven, T. (2001). Can somatic cell counts get too low?. In National Mastitis Council, *Proceedings of the National Mastitis Council Annual Meeting*, pp. 19-28. Acedido em Jun. 8, 2009, disponível em: <http://www.milkproduction.com/NR/rdonlyres/C3223E1C-C87E-4F4C-8D17-C73AEE5C917F/0/SchukkenNMC2001.pdf>.
- Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L. & Gonzalez, R.N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, 34, 579-596.
- Sears, P.M., Smith, B.S., English, P.B., Herer, P.S. & González, R.N. (1990). Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 73 (10), 2785-2789.
- Sears, P.M., Wilson, D. J., Gonzalez, R.N. & Hancock, D.D. (1991). Microbiological results from milk samples obtained premilking and postmilking for diagnoses of bovine intramamary infections. *Journal of Dairy Science*, 74 (12), 4183-4188.
- Seegers, H., Fourichon, C. & Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, 34, 475-491.
- Sethi, M.S., Tabel, H. & Misra, V. (1990). Activation of bovine monocytes and neutrophils by the Bb fragmento f complemente factor B: demonstration by the uptake of ³H-Deoxyglucose. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 54, 106-112.
- Seykora, A.J. & McDaniel, B.T. (1985a). Heritabilities of teat traits and their relationships with milk yield, somatic cell count and percent two-minute milk. *Journal of Dairy Science*, 68 (10), 2670-2683.

- Seykora, A.J. & McDaniel B.T. (1985b). Udder and teat morphology related to mastitis resistance: a review. *Journal of Dairy Science* 68 (8), 2087-2093.
- Shin, K., Hayasawa, H. & Lönnerdal, B. (2001). Inhibition of *Escherichia coli* respiratory enzymes by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate antimicrobial system. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 489-493.
- Sischo, W.M., Hird, D.W., Gardner, I.A., Utterback, W.W., Christiansen, K.H., Carpenter, T.E., Danaye-Elmi, C. & Heron, B.R. (1990). Economics of disease occurrence and prevention on California dairy farms: a report and evaluation of data collected for the National Animal Health Monitoring System, 1986-1987. *Preventive Veterinary Medicine*, 8, 141-156.
- Skalka, B. (1986). Bacteriocin activity of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and coagulase-negative staphylococcal strains. *Acta Vet Brno*, 55, 65-72.
- Smith, K.L., Harrison, J.H., Hancock, D.D., Todhunter, D.A. & Conrad, H.R. (1984). Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *Journal of Dairy Science*, 67 (6), 1293-1300.
- Smith, K.L., Todhunter, D.A. & Schoenberger, P.S. (1985). Symposium, environmental effects on cow health and performance: environmental mastitis, cause, prevalence, prevention. *Journal of Dairy Science*, 68 (6) 1531-1553.
- Smith, K.L. & Hogan, J.S. (1998). Milk quality: a worldwide perspective. In National Mastitis Council, *Proceedings of the National Mastitis Council Annual Meeting, St. Louis, Missouri, USA*, p. 1. Acedido em Nov. 12, 2011, disponível em: <http://www.nmconline.org/articles/keynote98.htm>.
- Smith, J.W., Ely, L.O., Graves, W.M. & Gilson, W.D. (2002). Effect of milking frequency on DHI performance measures. *Journal of Dairy Science*, 85 (12), 3526-3533.
- Sol, J., Sampimon, O.C., Snoep, J.J. & Schukken, Y.H. (1997). Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*, 80 (11), 2803-2808.
- Soltys, J. & Quinn, M.T. (1999). Selective recruitment of T- cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infection and Immunity*, 67 (12), 6293-6302.
- Sordillo, L.M., Nickerson, S.C. & Akers, R.M. (1989). Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. *Journal of Dairy Science*, 72 (1), 228-240.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K. & DeRosa, D. (1997). Symposium, bovine immunology: immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80 (8), 1851-1865.
- Sordillo, L.M. & Streicher, K.L. (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7 (2), 135-146.

- Sorensen, M.T., Nørgaard, J.V., Theil, P.K., Vestergaard, M. & Sejrsen, K. (2006). Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89 (12), 4632-4639.
- Sousa, J.M.B (2008). *A hiperqueratose do canal do teto nas explorações leiteiras portuguesas. Causas e efeitos microbiológicos*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária — Universidade Técnica de Lisboa.
- Souza, L.N., Estrela-Lima, A., Moreira, E.L.T., Ribeiro, L.G.R., Xavier, M.N., Silva, T.M.A., Costa, E.A. & Santos, R.L. (2009). Systemic canine protothecosis. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2 (2), 102-106.
- Stabel, J.R., Hurd, S., Calvente, L. & Rosenbusch, R.F. (2004). Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. in raw milk by a commercial on-farm high-temperature, short-time pasteurizer. *Journal of Dairy Science*, 87 (7), 2177-2183.
- Suojala, L., Orro, T., Järvinen, H., Saatsi J. & Pyörälä, S. (2008). Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infection in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50 (18). Acedido em Abr. 6, 2011, disponível em: <http://www.actavetscand.com/content/pdf/1751-0147-50-18.pdf>.
- Supré, K., Haesebrouck, F., Zadoks, R.N., Vaneechoutte, M., Piepers, S. & De Vliegher, S. (2011). Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science*, 94 (5), 2329-2340.
- Suriyasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E.N. & Schukken, Y.H. (2000a). Hyperketonemia and the impairment of the udder defence: a review. *Veterinary Research*, 31, 397-412.
- Suriyasathaporn, W., Schukken, Y.H., Nielen, M. & Brand, A. (2000b). Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *Journal of Dairy Science*, 83 (6), 1248-1255.
- Tadich, N.A., Carey, A., Porter, R., Ridley, J., Green, M.J. & Green, L.E. (1998). Case control study of risk factors for toxic mastitis in 26 dairy herds. *Veterinary Record*, 143 (13), 362-365.
- Takakura, N., Wakabayashi, H., Ishibashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Tamura, Y., Yamaguchi, H. & Abe, S. (2004). Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. *Journal of Medical Microbiology*. 54, 495-500.
- Taponen, S., Koort, J., Björkroth, J., Saloniemi, H. & Pyörälä, S. (2007). Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *Journal of Dairy Science*, 90 (7), 3301-3307.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (1999). *Committee for Veterinary Medical Products: bismuth subnitrate (extension to intramammary administration), summary report (2)*. Acedido em Nov. 15, 2011, disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500010982.pdf.

The International Dairy Federation (1999). Suggested interpretation of mastitis terminology. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 338, 4-24.

Thomson, K., Rantala, M., Hautala, M., Pyörälä, S. & Kaartinen, L. (2008). Cross-sectional prospective survey to study indication-based usage of antimicrobials in animals: results of use in cattle. *BMC Veterinary Research*, 4 (15). Acedido em Nov. 15, 2011, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-4-15.pdf>.

Thorberg, B.M., Kühn, I., Aarestrup, F.M., Brändström, B., Jonsson, P. & Danielsson-Tham, M.L. (2006). Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine mil and human skin [abstract]. *Veterinary Microbiology*, 115 (1-3), 163-172. Acedido em Abr. 29, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530988>.

Thorberg, B.-M., Danielsson-Tham, M.-L., Emanuelson, U. & Waller, K.P. (2009). Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, 92 (10), 4962-4970.

Trinidad, P., Nickerson, S.C. & Alley, T.K. (1990) Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 73 (1), 107-114.

Tyler, J.W. & Cullor, J.S. (2002). Mammary gland health and disorders. In B.P. Smith, *Large animal internal medicine: diseases of horses, cattle, sheep and goats*. (3rd edition). (pp. 1019-1038). St Louis: Mosby.

U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, and Food and Drug Administration (2009). Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance, 2009 revision. Acedido em Nov. 12, 2011, disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/MilkSafety/NationalConferenceonInterstateMilkShipmentsNCIMSModelDocuments/UCM209789.pdf>.

Vakil, J.R., Chandan, R.C., Parry, R.M. & Shahani, K.M. (1969). Susceptibility of several microorganisms to milk lysozymes. *Journal of Dairy Science*, 52 (8), 1192-1197.

Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T.J.C. & Kuiper, J. (2003). Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3), 379-414.

van den Borne, B.H.P., Halasa, T., van Schaik, G., Hogeveen, H. & Nielen, M. (2010a). Bioeconomic modeling of lactational antimicrobial treatment of new bovine subclinical intramammary infections caused by contagious pathogens. *Journal of Dairy Science*, 93 (9), 4034-4044.

van den Borne, B.H.P., van Schaik, G., Lam, T.J.G.M. & Nielen, M. (2010b). Therapeutic effects of antimicrobial treatment during lactation of recently acquired bovine subclinical mastitis: two linked randomized field trials. *Journal of Dairy Science*, 93 (1), 218-233.

- van den Borne, B.H.P., Vernooj, J.C.M., Lupindu, A.M., van Schaik, G., Frankena, K., Lam, T.J.G.M. & Nielen, M. (2011). Relationship between somatic cell count status and subsequent clinical mastitis in Dutch dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 102, 265-273.
- van Schaik, G., Lotem, M. & Schukken, Y.H. (2002). Trends in somatic cell counts, bacterial counts and antibiotic residue violations in New York state during 1999-2000. *Journal of Dairy Science*, 85 (4), 782-789.
- Vaz, A.K., Carneiro, D.M.V.F., Wolff, C., Dick, W. & Luciano, A.M. (2005). Mastite bovina por *Prototheca* spp. em Santa Catarina: relato de caso. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 4 (1), 72-75.
- Waage, S., Sviland, S. & Ødegaard, S.A. (1998). Identification of risk factors for clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 81 (5), 1275-1284.
- Waage, S., Mørk, T., Røros, A., Aasland, D., Hunshamar, A. & Ødegaard, S.A. (1999). Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 82 (4), 712-719.
- Waage, S. Ødegaard, S.A., Lund, A., Brattgjerd, S. & Røthe, T. (2001). Case-control study of risk factors for clinical mastitis in postpartum dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 84 (2), 392-399.
- Wagner-Storch, A.M. & Palmer, R.W. (2003). Feeding behavior, milking behavior, and milk yields of cows milked in a parlor versus an automatic milking system. *Journal of Dairy Science*, 86 (4), 1494-1502.
- Ward, G.E. & Schultz, L.H. (1974). Incidence and control of mastitis during the dry period. *Journal of Dairy Science*, 57 (11), 1341-1349.
- Ward, W.R., Hughes, J.W., Faull, W.B., Cripps, P.J., Sutherland, J.P. & Suntherst, J.E. (2002). Observational study of temperature, moisture, pH, and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four herds. *Veterinary Record*, 151 (7), 199-206.
- Waterman, D.F., Harmon, R.J., Hemken, R.W. & Langlois, B.E. (1983). Milking frequency as related to udder health and milk production. *Journal of Dairy Science*, 66 (2), 253-258.
- Weber, P.S.D., Toelboell, T., Chang, L.C., Tirell, J.D., Saama, P.M., Smith, G.W. & Burton, J.L. (2004). Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 75, 815-827.
- Weimer, P.J. (2001). Microbiology of the dairy animal. In E.H. Marth & J.L. Steele (Eds.), *Applied Dairy Microbiology*. (2nd edition). (pp. 1-58). Madison, USA: Marcel Dekker.
- Weiss, W.P., Hogan, J.S., Smith, K.L. & Hoblet, K. H. (1990). Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 73 (2), 381-390.

- White, D.G., Harmon, R.J., Matos, J.E.S. & Langlois, B.E. (1989). Isolation and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. *Journal of Dairy Science*, 72 (7), 1886-1892.
- Wilcox Jr., F.H. & Cole, R.K. (1957). The inheritance of differences in the lysozyme level of hens' egg white. *Genetics*, 42 (3), 264-272.
- Wilson, D.J., González, R.N. & Sears, P.M. (1995). Segregation or use of separate milking units for cow infected with *Staphylococcus aureus*: effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 78 (9), 2083-2085.
- Wilson, D.J., González, R.N. & Das, H.H. (1997). Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science*, 80 (10), 2592-2598.
- Wilson, D.J., González, R.N., Case, K.L., Garrison, L.L. & Gröhn, Y.T. (1999). Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 82 (8), 1664-1670.
- Woolford, M.W., Williamson, J.H., Day, A.M. & Copeman, P.J.A. (1998). The prophylactic effect of a teat sealer on bovine mastitis during the dry period and the following lactation [abstract]. *New Zealand Veterinary Journal*, 46 (1), 12-19. Acedido em Out. 12, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16032004>.
- World Holstein-Friesian Federation (2005). *International type evaluation of dairy cattle*. Acedido em Fev. 12, 2009, disponível em: http://www.whff.info/info/typetraits/type_en_2005-2.pdf.
- Wu, T., Samaranayake, L.P., Leung, W.K. & Sullivan, P.A. (1999). Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme. *Journal of Medical Microbiology* 48 (8), 721-730.
- Yamamura, A.A.M., Müller, E.E., Freire, R.L., de Freitas, J.C., Pretto-Giordano, L.G., Toledo, R.S. & Ribeiro, M.G. (2008). Factores de risco associados a mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*. *Ciência Rural*, 38 (3), 755-760.
- Zadoks, R.N., Allore, H.G., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Wellenberg, G.J., Gröhn, T.Y. & Schukken, Y.H. (2001). Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84 (12), 2649-2663.
- Zadoks, R.N., Gillespie, B.E., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Oliver, S.P. & Schukken, Y.H. (2003). Clinical epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiology and Infetion*, 130, 335-349.
- Zadoks, R.N. & Schukken, Y.H. (2006). Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 22 (1), 229-261.

ANEXOS

Anexo 1 — Poster submetido às XII Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, sob o tema «Mastites provocadas por *Prototheca* spp. numa exploração do Ribatejo».

Anexo 2 — Entidades clínicas acompanhadas durante o estágio.

Entidade clínica	Espécie animal			
	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Suínos
Doenças do aparelho cardiovascular				
Endocardite	✓	—	—	—
Pericardite traumática	✓	—	—	—
Defeito do septo interventricular	✓	—	—	—
Anemia	✓	—	✓	—
Doenças do aparelho respiratório				
Pneumonia de origem infecciosa	✓	—	✓	—
Pneumonia por aspiração	✓	—	—	—
Massa ou pólipos nasal	—	—	✓	—
Doenças do aparelho gastrointestinal (não infecciosas)				
Acidose ruminal	✓	—	✓	—
Retículo peritonite traumática	✓	—	—	—
Úlcera do abomaso	✓	—	—	—
Deslocamento do abomaso (à direita e à esquerda)	✓	—	—	—
Timpanismo	✓	—	✓	—
Peritonite	✓	—	—	—
Atresia <i>ani</i>	✓	—	—	—
Diarreia	✓	—	✓	—
<i>Ruminal drinkers</i>	✓	—	—	—
Doenças do aparelho gastrointestinal (infecciosas)				
Actinomicose	✓	—	—	—
Abcesso hepático	✓	—	—	—
Diarreia	✓	—	✓	—
Paratuberculose	✓	—	—	—
Doenças da pele e pêlos				
Ectima contagioso	—	—	✓	—
Papilomatose	✓	—	—	—
Dermatofitose	✓	—	—	—
Alopécia de origem não infecciosa (exemplo: alergia à gordura do leite)	✓	—	—	—
Feridas cutâneas (por vezes, com miasas)	✓	✓	✓	✓
Doenças do teto e do úbere				
Hiperqueratose da extremidade distal dos tetos	✓	—	—	—
Mastites	✓	—	✓	—
Dermatite do úbere	✓	—	—	—
Doenças do aparelho reprodutor				
Aborto	—	—	✓	—
Vaginite	—	—	✓	—
Metrite	✓	—	✓	—
Retenção de secundinas	✓	—	✓	—
Prolapso vaginal	—	—	—	✓

Anexo 2 (continuação).

Entidade clínica	Espécie animal			
	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Suínos
Doenças do aparelho urinário				
Constituintes urinários anormais e condições: hemoglobinúria e cetonúria	✓	✓	—	—
Onfalites	✓	—	—	—
Hérnias umbilicais	✓	—	—	—
Doenças do sistema músculo-esquelético				
Claudicações: dermatite digital, dermatite interdigital, panarício, laminite, úlcera da sola, hiperplasia interdigital, peeira	✓	✓	✓	—
Fraturas ósseas: metacarpo e tarso	✓	—	—	—
Artrite séptica	✓	—	—	—
Contractura do tendão flexor profundo das falanges	✓	—	—	—
Doenças do sistema nervoso				
Doenças cerebrais tóxicas e neurológicas: cetose nervosa	✓	—	✓	—
Lesão traumática do nervo peroneal	✓	—	—	—
Lesão traumática do nervo obturador	✓	—	—	—
<i>Head tilt</i>	—	—	✓	—
Doenças oculares				
Carcinoma da 3. ^a pálpebra	✓	—	—	—
Queratoconjuntivite infecciosa	✓	—	—	—
Doenças metabólicas				
Hipocalcémia	✓	—	—	—
Fígado gordo/cetose	✓	—	—	—
Fígado gordo/toxémia de gestação	—	—	✓	—
Outras doenças				
Síndrome da vaca caída	✓	—	—	—
Leptospirose	✓	—	✓	—
Linfadenite caseosa	—	—	✓	—
Anaplasmoses	✓	—	—	—
Clostridioses	✓	—	—	—
Malformações congénitas: recém-nascido com coluna vertebral incompleta	✓	—	—	—

Anexo 3 — Atividades desenvolvidas durante o estágio.

Atividade	Espécie Animal			
	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Suínos
Exame clínico	✓	✓	✓	—
Contenção	✓	✓	✓	—
Análise e interpretação de resultados do <i>Hi-stat</i>	✓	—	✓	—
Administração de fármacos e fluidos por via oral, endovenosa, subcutânea, intramuscular, intrauterina e tópica	✓	✓	✓	✓
Colheita de sangue para hemograma e pesquisa de endoparasitas	✓	—	✓	—
Colheita de líquido céfalo-raquidiano	✓	—	—	—
Colocação de catéteres	✓	—	✓	—
Entubação oroesofágica	✓	—	✓	—
Entubação nasoesofágica	✓	—	—	—
Alimentação de recém-nascidos	✓	—	✓	—
Recolha de pelos para pesquisa de fungos	✓	—	—	—
Punção e drenagem/lavagem de abscessos	✓	—	✓	✓
Tratamento de feridas/pensos	✓	✓	✓	✓
Aparagem funcional e curativa de úngulas	✓	✓	✓	—
Descorna química (pasta ^[1]) e física (com ferro quente ^[1] e com fio de serra)	✓	—	✓	—
Aplicação de brincos	✓	—	—	—
Abomasopexia ⁽²⁾	✓	—	—	—
Cesariana	—	—	✓	—
Inseminação artificial ⁽¹⁾	✓	—	✓	—
Ecografias reprodutivas ⁽¹⁾	✓	—	✓	—
Resolução de partos distócicos	✓	—	✓	—
Resolução de prolapso vaginal	—	—	—	✓
Sanidade animal (colheita de sangue, vacinação, desparasitação)	✓	—	✓	—
Análise e interpretação de resultados do contraste leiteiro	✓	—	—	—
Teste Californiano de Mastites (TCM)	✓	—	✓	—
Recolha e processamento laboratorial de amostras de leite para pesquisa de agentes patogénicos de mastite	✓	—	✓	—
Ordenha	✓	—	—	—
Necrópsia	✓	✓	✓	—
Eutanásia	✓	—	✓	—
Apresentação de caso clínico subordinado ao tema: «Morte súbita em ruminantes»				
Submissão de poster às XII Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, sob o tema «Mastites provocadas por <i>Prototheca</i> spp. numa exploração do Ribatejo»				

⁽¹⁾Apenas observação;

⁽²⁾Observação e, em alguns casos, sutura.

Anexo 4 — Classificação de mastites de acordo com a severidade (original)

Grau	Sinais clínicos
1	a) Sem sinais clínicos de mastite; b) Tipo de mastite detetável comumente por mensuração de CCS. Por exemplo, com recurso ao TCM ou a contadores eletrónicos automáticos (por exemplo, <i>fossomatic cell counter</i>).
2	a) Com sinais clínicos localizados de mastite, por exemplo: <ul style="list-style-type: none"> i. ligeiro aumento ou aumento da consistência do teto e/ou do quarto; ii. ligeira alteração ou alteração da temperatura do quarto; iii. ligeira alteração ou alteração da cor do quarto; iv. ligeiras alterações macroscópicas do leite: da cor, da consistência, etc. v. ligeira quebra da produção de leite (inferior a 20 %).
3	a) Com sinais generalizados de doença, por exemplo: <ul style="list-style-type: none"> i. aumento da consistência do quarto e/ou do úbere; ii. alteração da temperatura do quarto e/ou do úbere; iii. alteração da cor do quarto e/ou do úbere; iv. alterações macroscópicas do leite: da cor; da consistência, por exemplo, leite demasiadamente aquoso («aguadilha») ou com muitos coágulos de fibrina («farrapos»); etc. v. grande quebra da produção de leite (superior a 20 %), sem explicação aparente; vi. febre; vii. prostração; viii. anorexia; ix. dificuldade ou relutância em levantar-se.